



TITLE:

浮遊性動物細胞の固定化培養に関する研究(Dissertation_全文)

AUTHOR(S):

山地, 秀樹

CITATION:

山地, 秀樹. 浮遊性動物細胞の固定化培養に関する研究. 京都大学, 1994, 博士(工学)

ISSUE DATE:

1994-11-24

URL:

<https://doi.org/10.11501/3098583>

RIGHT:

浮遊性動物細胞の固定化培養に関する研究

1 9 9 4 年

山 地 秀 樹

目 次

緒 論	
1. 動物細胞培養による有用物質生産	1
2. 浮遊性動物細胞の固定化培養に関する既往の研究	6
3. 本研究の目的と内容	16
参考文献	18
第1編 アルギン酸カルシウムゲルによるハイブリドーマの包括固定化と培養特性	
第1章 膨張層型培養槽における固定化ハイブリドーマの培養とモノクローナル抗体生産	
1. 1 緒言	23
1. 2 実験	
1. 2. 1 細胞と培地	24
1. 2. 2 アルギン酸カルシウムゲルへの包括固定化	25
1. 2. 3 固定化細胞の静置培養	25
1. 2. 4 膨張層型培養槽における固定化細胞の培養	26
1. 2. 5 分析方法	26
1. 3 結果と考察	
1. 3. 1 固定化細胞の静置培養	28
1. 3. 2 膨張層型培養槽における連続培養	30
1. 3. 3 ゲル構造の保持と細胞の漏出	32
1. 4 結論	34
参考文献	34
第2章 固定化ハイブリドーマの酸素消費速度	
2. 1 緒言	36
2. 2 実験	
2. 2. 1 細胞と培地	37
2. 2. 2 固定化細胞の培養	37
2. 2. 3 酸素消費速度の測定	39

2. 2. 4	固定化細胞のグルコース消費速度と乳酸生産速度の測定	41
2. 2. 5	分析方法	41
2. 3	結果と考察	
2. 3. 1	固定化していない細胞の酸素消費速度	42
2. 3. 2	固定化細胞の酸素消費速度	43
2. 3. 3	固定化細胞の比酸素消費速度の増加とゲル粒子内における細胞のコロニーの形成との関係	46
2. 3. 4	固定化細胞のグルコース消費と乳酸生産	50
2. 1	結論	53
	参考文献	54

第II編 多孔性の細胞保持粒子を用いるミエローマの固定化と培養特性

第3章 ポリビニルホルマール樹脂多孔質体を細胞保持粒子として用いる浮遊性動物細胞の固定化

3. 1	緒言	55
3. 2	実験	
3. 2. 1	細胞と培地	56
3. 2. 2	細胞保持粒子	57
3. 2. 3	固定化細胞の静置培養	58
3. 2. 4	固定化細胞の振とう培養	58
3. 2. 5	走査電子顕微鏡 (SEM) による固定化細胞の観察	59
3. 2. 6	分析方法	59
3. 3	結果と考察	
3. 3. 1	静置培養による固定化の可能性の検討	60
3. 3. 2	SEM による固定化細胞の観察	63
3. 3. 3	固定化細胞の振とう培養	64
3. 4	結論	67
	参考文献	67

第4章 固定化動物細胞の循環層型培養槽における長期培養

4. 1	緒言	69
4. 2	実験	
4. 2. 1	細胞、培地、および細胞保持粒子	70

4. 2. 2	循環層型培養槽による培養	71
4. 2. 3	分析方法	73
4. 3	結果と考察	
4. 3. 1	保持粒子への細胞の播種	74
4. 3. 2	培養初期より保持粒子の循環を行なう培養	74
4. 3. 3	保持粒子を静置後循環させる2段階培養	79
4. 4	結論	82
	参考文献	82

第5章 固定化動物細胞の静置・振とう培養下における増殖・死滅挙動

5. 1	緒言	84
5. 2	実験	
5. 2. 1	細胞、培地、および細胞保持粒子	85
5. 2. 2	細胞の播種と培養	86
5. 2. 3	MTT 変換活性の測定と固定化生細胞の染色	86
5. 2. 4	LDH 活性の測定	87
5. 2. 5	固定化していない細胞の生細胞密度の測定	87
5. 3	結果と考察	
5. 3. 1	MTT 変換活性の測定による固定化生細胞密度の推定	88
5. 3. 2	固定化していない細胞の細胞内 LDH 活性	90
5. 3. 3	静置・振とう培養下における固定化細胞の増殖挙動	92
5. 3. 4	保持粒子内における生細胞の分布	95
5. 3. 5	初期細胞密度の影響	99
5. 4	結論	101
	参考文献	102

第6章 固定化動物細胞の連続培養下における増殖速度解析

6. 1	緒言	103
6. 2	実験	
6. 2. 1	細胞、培地、および細胞保持粒子	104
6. 2. 2	固定化細胞の細胞内 LDH 比活性と MTT 変換比活性の測定	105
6. 2. 3	固定化細胞の灌流培養	106
6. 2. 4	LDH 活性の測定	107
6. 2. 5	MTT 変換活性の測定と固定化生細胞の染色	108
6. 2. 6	その他の分析方法	109

6. 3 累積細胞数および比速度の計算方法	
6. 3. 1 累積細胞数の計算方法	109
6. 3. 2 固定化細胞の比速度の計算方法	112
6. 4 結果と考察	
6. 4. 1 固定化細胞の細胞内 LDH 比活性および MTT 変換比活性	114
6. 4. 2 LDH 活性測定による漏出生細胞密度と死滅細胞数の評価	116
6. 4. 3 固定化細胞の増殖特性	119
6. 4. 4 保持粒子内の生細胞分布の推移	124
6. 5 結論	127
参考文献	127
総括	129
謝辞	135
本研究に関連する著者の発表論文	136

緒 論

1. 動物細胞培養による有用物質生産

遺伝子工学の著しい進展にともない、1970 年代後半以降、ヒトや動物が発現している遺伝子を大腸菌や酵母などの微生物に組込み、組換え微生物の培養によりインスリンやソマトスタチンなどの生理活性物質を生産する方法は大きな成功を収めた。ところが、対象となる生理活性物質の種類が増えるにしたがって、微生物による生産には不適当なものがあり、組換え微生物法が必ずしも万能ではないことが明らかになった。これは、糖鎖の付加やアルキル化、アミド化などの修飾を必要とするタンパク質や複雑なサブユニット構造をもつ高分子量のタンパク質は、微生物を宿主として発現させると、動物細胞が産生する天然型のものと厳密に同じものにならないため、動物の生体内で十分な生理活性や安定性が得られないことによる。このような生理活性物質を生産するには本来その発現系である動物細胞を宿主として用いざるをえず、動物細胞は生体由来の有用生理活性物質を生産するための生体触媒として重要な位置を占めるようになった。

現在、インターフェロン、ティッシュプラスミノゲンアクチベータ、エリスロポイエチン、血液凝固因子、コロニー刺激因子などの生理活性物質やウイルスワクチン、モノクローナル抗体などが、動物細胞培養により生産されており、それらを **Table 0.1** にまとめて示す。今後さらに、動物細胞培養による有用物質の生産は、その種類と規模を拡大していくものと思われる。しかしながら、動物細胞を大量にしかも効率よく培養する技術は、微生物培養に比べるとまだ十分に確立されたものとはいえず、近年、精力的に研究開発が進められている。

有用物質生産に用いられる動物細胞は、通常、無限に増殖可能な株化された細胞である。このような動物細胞と従来抗生物質などの生産に用いられてきた

Table 0.1. Typical products from animal cell cultures

Cell type	Product	Potential use	Reference
Hybridoma cells	Monoclonal antibodies	Diagnostic and therapeutic applications	1)
Lymphoblastoid cells and human fibroblast cells	Interferons	In viral disease states	2,3)
Baby hamster kidney cells	Viral vaccines	c.g. polio, foot and mouth disease	4)
Genetically engineered animal cells:			
Myeloma cells	Chimeric antibodies	Therapeutic applications	5)
Chinese hamster ovary cells	Tissue plasminogen activator	In thrombosis therapy	6)
Chinese hamster ovary cells and baby hamster kidney cells	Erythropoietin	In anemia therapy	7,8)

微生物とを有用物質生産手段という観点から比較したものを、**Table 0.2** に示す。表からわかるように、動物細胞培養の一般的な問題点としては、

- (1) 動物細胞は細胞壁をもたないため物理的外力に対して脆弱であり、過度の通気攪拌をとまなう条件下で培養することはできない、
- (2) 細胞の代謝、増殖を行なわせるのに血清を必要とする場合が多い、
- (3) 器壁の表面に接着していないと生育できない細胞がある、
- (4) 動物細胞は、栄養価の高く pH が中性付近の培地中でのみ生育でき、また

Table 0.2. Comparison of animal and microbial cells

Property	Microbial	Animal
Size (diameter)	1-10 μm	10-100 μm
Growth rate (doubling time)	0.2-2 h	10-72 h
Metabolism	Internally regulated	Internally and externally regulated Typically require serum to grow
Metabolic activity (production rate)	High	Low
Structure	Have a rigid cell wall	Have only a fragile plasma membrane
Environment	Typically grow in submerged culture	Anchorage-dependent cells require a suitable surface to grow

その増殖速度が微生物に比べてきわめて小さいため、培養中に雑菌汚染 (コンタミネーション) が生じやすい、

- (5) 細胞の増殖速度や有用物質の生産速度がきわめて小さい、などを挙げることができる。これらのことから、動物細胞は微生物に比べて厳格な培養条件が要求され、動物細胞の特性に応じた培養技術を開発する必要があることがわかる。

1)のような動物細胞培養のもつ課題に対して、種々のアプローチが試みられている。動物細胞が脆弱であることや雑菌汚染が起こりやすいことに対しては培養槽のハードウェアの改善や新たな培養技術の開発⁹⁾、血清の必要性に対して

は無血清培地の開発¹⁰⁾が進められてきた。

動物細胞の増殖速度や有用物質生産速度が小さい点に対しては、2つの方向のアプローチがある。1つは細胞自体の増殖能や物質生産能を増強することである。遺伝子操作を施した細胞の物質生産能の増強に関しては、種々の発現系の開発、転写効率や翻訳効率を向上させることなどが検討されている¹¹⁾。もう1つのアプローチとしては、細胞の増殖に要する時間よりも十分長い時間にわたって動物細胞を高密度状態で培養し、有用物質を継続的に産生させるような技術を確認することである。このような技術の確認は、たとえ細胞自体の増殖能や物質生産能が増強されたとしても、工業的規模での有用物質の生産を考えると不可欠なものである。

しかしながら、動物細胞培養の高密度化は、単純な培養方法で実現することは困難である。たとえば、ハイブリドーマを培養フラスコ内で静置培養したり工業的規模で回分培養¹⁾を行なうと、細胞は通常 10^6 cells/cm³ 程度の細胞密度で飽和に達する。これは、培養液中に占める細胞の体積でいうと0.1%程度でしかなく、微生物と比較して格段に低い。このような動物細胞の高密度化を妨げる要因としては、(1) アンモニウムイオン、乳酸などの有害代謝産物の培養系内への蓄積、(2) グルコース、アミノ酸など必須栄養分や溶存酸素の枯渇、が挙げられる。

したがって、動物細胞を高密度状態で培養するためには、細胞を培養系内に保持したまま、有害代謝産物を除去し新たに栄養分や酸素を供給すればよいと考えられる。これは最も単純には、細胞を培養系内にとどめたまま培地を流してやることによって達成でき、このような培養法は灌流培養法 (perfusion culture) とよばれている。

なお、動物細胞はその生育様式から、培養器壁に接着していないと生育できない付着性細胞と、浮遊状態で生育し得る浮遊性細胞との大きく2つに分けら

れる。浮遊性の動物細胞は、培地との比重差が小さく、直径 10 μ m 程度の大きさの脆弱なものであるため、細胞を傷つけないように培地と分離するのは困難な作業となる。したがって、浮遊性細胞の灌流培養において確立しなければならない最重要の技術は、細胞と培養液の分離法であり、(1) 細胞を懸濁状態のままで培養するか、(2) 細胞を適当な担体に固定化して培養するか、によって大きく異なる。

ハイブリドーマなどの浮遊性細胞を懸濁状態のままで培養する場合、フィルターによるろ過^{9,12,13)}、重力沈降^{14,15)}、遠心分離¹⁶⁾などの分離法が開発されている。しかし、これらの方法は、(1) フィルターの目詰まりが起こる、(2) 分離効率が低い、(3) 重力加速度が細胞に悪影響をおよぼす可能性がある、など、長期連続運転やスケールアップの点で課題を残している。

一方、固定化法を利用する培養では、浮遊性細胞と培養液の分離を簡単にかつ効率よく行なうことができるため、細胞を懸濁状態で培養するのに比べて、はるかに容易に灌流培養が達成できる。また、付着性の動物細胞は培養器壁に接着した状態で生育するため、付着性細胞の培養は必然的に細胞の固定化をとらなければならない。動物細胞を固定化して培養すると、灌流培養が容易に達成できるほかにも次のような利点が期待できる。

- (1) 細胞が固定化担体内に保持されるため、物理的外力に弱い動物細胞が保護される。
- (2) (1) の理由から、固定化法によっては、培地の供給速度を大きくしたり、直接気泡通気を行なうことが可能となる。これらは、バイオリアクターの小容積化や目的生産物の高濃度化につながる。
- (3) 細胞の取扱いが簡単になる。
- (4) 生体触媒の再利用が容易である。

- (5) 目的生産物が細胞外に分泌される場合、生産物と細胞との分離が容易である。
- (6) 固定化担体内において、細胞が低密度状態にあるのとは異なる微小環境が形成されることにより、細胞の物質生産性などが向上する可能性がある^{17,18,19)}。

また、動物細胞は微生物に比べて酸素消費速度が小さいため、固定化担体を有効に利用した増殖や固定化担体内での高密度化が可能になると期待される^{20,21)}。したがって、工業生産への応用を考えると、動物細胞の固定化培養は、有用物質生産を行なうための動物細胞培養法として有望な方法であると思われる。

なお、上にも述べたように、動物細胞はその生育様式から分けて、培養器壁に接着していないと生育できない付着性細胞と、浮遊状態で生育し得る浮遊性細胞との2種類のものがある。後者の代表的なものとしては、モノクローナル抗体の生産に用いられるハイブリドーマ²²⁾や、遺伝子操作を施すことによりキメラ抗体などの組換え抗体を生産するための宿主として最近注目されているミエローマ²⁾が挙げられる。本研究は、浮遊性細胞を対象として行なったものである。よって、次節では、主として浮遊性動物細胞の固定化培養に関する既往の研究について述べる。

2. 浮遊性動物細胞の固定化培養に関する既往の研究

動物細胞は、生育可能な環境条件(温度、pH、イオン強度など)の許容範囲が狭く、また毒性の物質に対してきわめて敏感である。このため、動物細胞に適用可能な固定化法は、微生物に比べると制限される。細胞が固定化担体内で増殖できかつ有用物質を生産できるような温和な方法でないと、有用物質生産を行なうための固定化培養法として用いることは不可能である。たとえば、微生

物を固定化するのに用いられるグルタルアルデヒドやアクリルアミドは、動物細胞にとって有害であるため、使用は不適切と考えられる。

これまでに報告されている動物細胞の固定化法は、(1)ゲル包括法、(2)マイクロカプセル法、(3)ホローファイバー法、および(4)多孔性の担体を用いる固定化法、の大きく4つのグループに分けられる。ゲル包括法やマイクロカプセル法は、細胞を担体内に人為的に固定化するいわゆる"active"な固定化法であり、これに対し、多孔性の担体を用いる固定化法は"passive"な方法といえる。

1) ゲル包括法

ゲル包括法は、高分子素材のゲルを形成する際に細胞を共存させることにより、細胞をゲル内に包み込んで固定化する方法である。ゲル包括法に用いられる高分子素材としては、アガロースやアルギン酸などの海藻起源の多糖類が、温和な反応条件の下で無害な担体内に細胞を包括できるため、広く検討されている。

Nilsson ら²³⁾は、加温して溶解したアガロースに細胞懸濁培地を加えて混合し、これをパラフィンオイル中で分散させてから冷却することにより、粒径 80-200 μm のアガロースゲル粒子に動物細胞を包括固定化する方法を開発した。彼らは、この方法により固定化したハイブリドーマやリンパ芽球様細胞(lymphoblastoid)をスピナーフラスコを用いて1-3週間にわたって培養し、モノクローナル抗体やインターロイキン2の連続生産を行なった。

Shirai ら²⁴⁾は、細胞懸濁培地とアルギン酸ナトリウム溶液を混合したものを CaCl_2 水溶液に滴下することによりハイブリドーマをアルギン酸カルシウムのゲル粒子に固定化し、ゲル粒子を膨張層型培養槽に充填して無血清培地を用いた連続培養を行なった。ゲル内の生細胞密度は $1 \times 10^7 \text{ cells/cm}^3\text{-gel}$ 以上の高密度に達し、40日間以上のモノクローナル抗体の生産が可能であった。Shirai らは

また、アルギン酸ゲルに BHK (baby hamster kidney) 細胞などの付着性動物細胞を固定化して長期間培養可能なことや²⁵⁾、ストロンチウムイオンやグルコース 1-リン酸を用いることによりアルギン酸ゲルが強固な状態のまま長期培養が可能なことを報告している²⁶⁾。

また、Lee らは、ある種のハイブリドーマを無血清培地を用いて浮遊懸濁状態で培養すると、血清培地を使用した場合に比べて、細胞のモノクローナル抗体の生産性が低下するのに対し、アルギン酸カルシウムゲルに固定化して培養を行なうと、無血清培地を用いた場合でも細胞のモノクローナル抗体の生産性が安定に維持されることを報告している¹⁸⁾。彼らはまた、アルギン酸カルシウムゲルにハイブリドーマを固定化して培養すると、固定化せずに培養した場合に比べて細胞 1 個あたりのモノクローナル抗体の生産性が 3 倍以上高くなったことを報告している¹⁹⁾。

Iijima ら²⁷⁾ は、アルギン酸カルシウムゲル包括法の弱点である細胞の漏出やゲル粒子の脆弱さを改善する目的で、アルギン酸ゲル粒子をウレタンポリマーで被覆する方法を開発した。この方法は、まず細胞を固定化したアルギン酸ゲル粒子をウレタンプレポリマーに浸漬した後、フルオロカーボン中に移しアルギン酸ゲル粒子表面の水とウレタンプレポリマーとを反応させ、ゲル粒子の表面にウレタンポリマーの皮膜を形成させるものである。彼らは、この方法により固定化したハイブリドーマを気液固 3 相流動層型のバイオリアクターを用いて培養し、50 日間におよぶモノクローナル抗体の連続生産が可能であったことを報告している²⁸⁾。

Mano ら²⁹⁾ は、アルギン酸を溶解したポリアクリル酸溶液に細胞懸濁培地を混合したものを CaCl_2 水溶液に滴下することにより、ハイブリドーマをアルギン酸・ポリアクリル酸ゲル粒子に固定化する方法を開発した。彼らは、ゲル粒子に固定化した細胞を気液固 3 相流動層型のバイオリアクターを用いて培養す

ると、ゲル粒子が破壊されることなく 1 か月間以上のモノクローナル抗体の生産が可能であったことを報告している。

Kamihira ら³⁰⁾ は、細胞毒性のない光架橋性樹脂に細胞懸濁培地を混合したものを NaCl 水溶液に滴下して粒子を形成させた後に、紫外線を照射し光架橋性樹脂を重合させることにより、ハイブリドーマなどの動物細胞を包括固定化できることを報告している。彼らはまた、光架橋性樹脂にアルギン酸を混合することによりハイブリッドゲルを調製する方法や、光架橋性樹脂にゼラチン粉末を混合することにより多孔性のゲル粒子を調製する方法も開発している。光架橋性樹脂とアルギン酸のハイブリッドゲルにハイブリドーマを固定化し気液固 3 相流動層型のバイオリアクターで培養を行なうと、50 日間以上のモノクローナル抗体の連続生産が可能であったことが報告されている。

以上に述べてきたように、ゲル包括固定化法を用いると、ゲル粒子内で 1×10^7 cells/cm³ 以上の高密度化と構造の簡単なバイオリアクターによる有用物質生産が可能である。しかし、細胞の固定化の操作が繁雑なものもあり、細胞を固定化したゲル粒子の大量生産技術の開発が今後必要となる。

2) マイクロカプセル法

動物細胞を半透膜のカプセル内に封入して培養するのがマイクロカプセル法である。

Lim ら³¹⁾ は、細胞をアルギン酸カルシウムゲル粒子に包括した後、ゲル粒子をポリリジンの溶液に浸漬しゲル粒子の表面にアルギン酸とポリリジンからなる安定な半透膜を形成させ、その後アルギン酸カルシウムを溶解することにより細胞を封入したマイクロカプセルを調製する方法を開発した。ハイブリドーマをこのようなカプセル内に封入して培養すると、細胞はカプセル内で 1×10^8 cells/cm³ 程度の高密度となり、またカプセルを形成する膜の孔径が小さいため、

高分子量のモノクローナル抗体はカプセル内に蓄積され数 mg/ml の濃度に達することが報告されている³²⁾。

Yoshioka ら³³⁾ は、ハイブリドーマを懸濁した培地とカルボキシメチルセルロースを混合したものをキトサン溶液に滴下することで、細胞を封入したカルボキシメチルセルロースとキトサンとからなるマイクロカプセルを調製する方法を開発した。彼らは、ハイブリドーマをカプセル内に封入して 10 日間程度の回分培養を行なったが、細胞はカプセル内で最高 1×10^7 cells/cm³ の密度となり、カプセル内のモノクローナル抗体の濃度はカプセル外の濃度の 4 倍に達したことを報告している。

マイクロカプセル法は、カプセル内での高細胞密度化や生産物の蓄積が可能で優れた方法である。その反面、細胞の固定化の操作が複雑であり、細胞を封入したマイクロカプセルを大量に調製するのに特別なプロセスが必要である。また、生産された抗体などを回収するのにカプセルを破壊しなければならず、複雑な操作を要する。さらに、カプセル内で死滅した細胞由来のタンパク質分解酵素などによる生細胞や生産物の傷害も懸念され、長期培養が困難となる場合も予想される。

3) ホローファイバー法

ホローファイバー法はいくつかの培養形式が試みられているが、代表的なものとしては、ホローファイバーのモジュールと培地貯槽を連結する培地の循環路を構成し、モジュール内の中空系の外側の空間に細胞を封入し、中空系の内側に培地を流すことにより、細胞を生育させる方法が挙げられる。もともと付着性動物細胞の培養用に開発された方法であるが、ハイブリドーマなどの浮遊性細胞の培養にも適用され、リアクター内で 1×10^7 cells/cm³ 程度の高密度培養が可能であることが報告されている³⁴⁾。また、目的生産物の分子量に応じて適

当な大きさの孔径を有するファイバーを使用することにより、モジュール内のファイバーの外側に生産物を高濃度に蓄積させることも可能である。

ホローファイバー法の問題点は、培地の流れ方向や流れに垂直な方向に酸素、栄養分、代謝産物などの濃度勾配が生じる点である。このためモジュール内における培養環境は均一でなく、工業的規模で応用するには、スケールアップや培養環境の制御技術の開発が今後の課題である。

4) 多孔性の担体を用いる固定化法

上に述べたゲル包括法やマイクロカプセル法は、細胞を担体内に人為的に固定化するいわゆる "active" な固定化法である。これに対し、Atkinson ら³⁵⁾ は、フィルムやブロックを形成する微生物を、球状に加工したステンレススチールワイヤーや立体網状構造を有するポリウレタンフォーム (Fig. 0.1) などの多孔

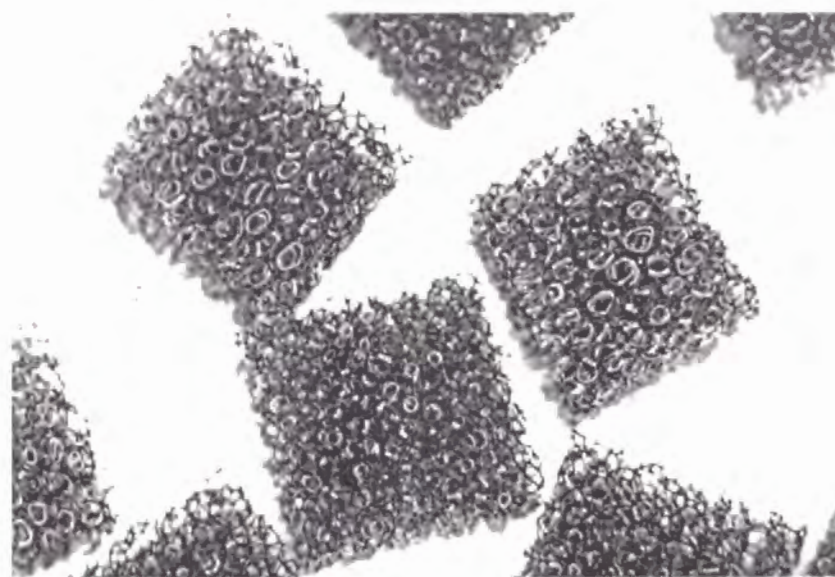


Fig. 0.1. Reticulated polyurethane foam biomass support particles (6 × 6 × 6 mm cubes; average pore size, 40 pores per linear inch)

性の担体粒子に "passive" に固定化する方法を開発した。この固定化法は、微生物などの細胞がもつ固体表面への付着力あるいは結合力を利用し、その増殖過程において細胞が多孔性の粒子内に自然に固定化されるものである。Atkinsonらは、これらの多孔性の担体粒子を Biomass Support Particles (BSPs と略す)、すなわち細胞保持粒子と名付けた。BSPs を用いる固定化法は、active な固定化法と比べて次のような特徴を有する。

- (1) ゲル化剤など固定化のための薬剤が不要である。
- (2) 無菌的取扱いが容易である。
- (3) 基質や生産物の固定化担体内拡散係数が大きい。
- (4) 固定化担体が物理的に強固である。
- (5) 固定化担体が再使用可能である。

この多孔性の保持粒子による固定化法は、Table 0.3 に示すように、これまでに糸状菌、放線菌、酵母、バクテリアなどの種々の微生物から植物細胞まで幅広く応用されている。このような多孔性の担体を用いる固定化法は、最近、動物細胞培養にも応用され、注目を集めている。

動物細胞培養において多孔性の担体は、まず付着性細胞に対して用いられた。付着性の動物細胞は、その生育に足場となる壁面との接着を必要とする。付着性細胞を培養するための接着担体として開発された球形のマイクロキャリアーは、従来その球面上に細胞を付着させるものであった。このようなマイクロキャリアーの単位体積あたりの付着面積を増大させる目的で、Nilsson ら⁵¹⁾ は、ゼラチンを原料にして多孔性のマイクロキャリアーを調製する方法を開発し、それを用いて付着性細胞の培養を行なった。多孔性のマイクロキャリアーは、細胞が粒子内部でも生育できるため、より高細胞密度化が可能となるだけでな

Table 0.3. Typical reported applications of biomass support particles (BSPs)

Organism	BSPs	Product and application	Reference
A. Microbial cell			
Mixed culture (aerobic)	PUF	Waste treatment	36)
Mixed culture (anarobic)	PUF	Methane	37)
<i>Escherichia coli</i>	SF	Amylase	38)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> & <i>Saccharomyces uvarum</i>	SS & PEF	Ethanol	39)
<i>Clostridium acetobutylicum</i>	NS	Acetone, butanol, ethanol	40)
<i>Trichoderma viride</i>	SS	Cellulase	41)
<i>Mucor ambiguus</i>	PUF	γ -Linolenic acid	42)
<i>Rhizopus chinensis</i>	PUF	Lipase	17)
<i>Rhizopus arrhizus</i>	PUF	Fumaric acid	43)
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	PUF	Lignin peroxidase	44)
<i>Penicillium chrysogenum</i>	PUF	Penicillin	45)
<i>Botryococcus braunii</i>	PUF	Hydrocarbon	46)
<i>Thiobacillus ferrooxidans</i>	PUF	Ferrous iron oxidation	47)
B. Plant cell			
<i>Capsicum frutescens</i>	PUF	Capsaicin	48)
<i>Humulus lupulus</i>	PUF	Hop flavours	49)
<i>Coffea arabica</i> L.	PUF	Caffeine	50)

PUF, polyurethane foam; SF, silicone foam; SS, stainless steel; PEF, polyester foam; NS, Natural sponge

く、すべての細胞がその外表面上に露出している通常のマイクロキャリアーに比べて、機械的な衝撃力に対する細胞の保護効果があったことが報告されている。

また、Matsushita ら⁵²⁾ は、骨格間に膜状構造を残し完全な網状構造となって

いない平均孔径 $500\text{ }\mu\text{m}$ のポリウレタンフォームが、Vero や CHO-K1 などの付着性細胞の接着担体として利用できることを報告している。ポリウレタンフォームの充填層と気泡塔のあいだで培地を循環させる培養システムを用いると、担体内で 10^7 cells/cm^3 以上の高密度培養が達成できたことが報告されている。

Ogawa ら⁵³⁾ は、セルロースでできた発泡体が付着性細胞の接着担体として利用できることを報告している。彼らは、形質転換した血管内皮細胞をセルロース発泡体に固定化し、気液固 3 相流動層型のバイオリアクターを用いて培養を行なったところ、細胞は担体内で 10^7 cells/cm^3 以上の高密度に達し、80 日間以上の長期培養が達成できたことを報告している。

次に、浮遊性動物細胞に対して、多孔性の担体を用いる固定化法が応用されたものについて述べる。

アメリカの Verax 社は、コラーゲンからなるスポンジ状の担体粒子にハイブリドーマを固定化して培養するシステムを開発した⁵⁴⁾。このシステムは、酸素供給部分と液固流動層型培養槽とから構成され、細胞とコラーゲンとの親和性により、細胞は多孔性の担体粒子内に保持されたまま培養される。この方法を用いると、担体内で 10^8 cells/cm^3 程度の高密度培養が達成できることが報告されている。しかし、Verax 社のシステムは固定化担体粒子がきわめて高価である点が問題である。

Yamaji ら⁵⁵⁾ は、上のような特殊な担体でなくとも安価な合成高分子からなる多孔質体のなかで比較的孔径の小さいもの、すなわち平均孔径が $30\text{--}100\text{ }\mu\text{m}$ のポリビニルホルマール樹脂多孔質体を用いることにより、浮遊性動物細胞の固定化が可能であり、担体内で 10^7 cells/cm^3 程度の高密度培養が容易に達成できることを報告している。彼らはまた、気液固 3 相流動層型の培養槽を用いて、ポリビニルホルマール樹脂多孔質体に固定化したマウスミエローマの培養を行

ない、100 日間にわたる高密度培養が達成できたことを報告している⁵⁶⁾。

このポリビニルホルマール樹脂多孔質体を用いる固定化法は、付着性細胞であるラット遊離肝細胞の固定化にも応用可能であり⁵⁷⁾、担体内で 10^7 cells/cm^3 以上の高密度化が達成できたことが報告されている⁵⁸⁾。現在、この固定化培養技術を利用したハイブリッド型人工肝臓の開発が進められている。

また、寺嶋ら⁵⁹⁾ は、セルロース発泡体に陽電荷基を有するポリエチレンイミンを導入することにより、担体内に固定化できる細胞量を増大させることができたことを報告している。このような発泡体にハイブリドーマを固定化し、気液固 3 相流動層型のバイオリアクターを用いて培養を行なうと、担体内で 10^7 cells/cm^3 以上の高密度培養が達成できたことが報告されている。

以上は主として粒子状の多孔性担体を用いるものであったが、多孔性担体を充填層にして使用する方法もいくつか提案されている。Murdin ら⁶⁰⁾ は、ポリエステルフォームの充填層と気泡塔から構成され、気泡塔に通気することにより充填層と気泡塔の間で培地を循環させる培養槽を用いて、ハイブリドーマの回分培養を行なった。細胞は充填層部分に捕捉され、浮遊懸濁培養に匹敵するモノクローナル抗体の生産が可能であったことが報告されている。また、Racher ら⁶¹⁾ と Kurosawa ら⁶²⁾ は、それぞれ多孔性のガラス粒子を充填層にした培養システムを作製し、ハイブリドーマを充填層部分に捕捉した状態で培養が可能であったことを報告している。

多孔性担体を充填層にして細胞を培養する場合、上述のホローファイバー法同様、培地の流れ方向や流れに垂直な方向に酸素、栄養分、および代謝産物の濃度勾配が生じるため、スケールアップや培養環境の適切な制御を行なうための工夫が必要と思われる。

3. 本研究の目的と内容

動物細胞の固定化培養は、1 節において述べたように、高密度培養や有用物質の効率的生産が可能な動物細胞培養法として有望視されている方法の一つである。このため2 節で述べたように種々の固定化法が検討されているが、工業的に応用するには解決すべき課題が残されているものが多い。また、動物細胞を固定化することにより現れる特性の把握は、バイオリアクターの合理的設計や最適操作を行なうために重要な課題であるが、固定化細胞の培養特性に関する報告は少ない。したがって、工業的に応用可能な動物細胞の固定化培養技術の開発や固定化動物細胞の特性の解明が望まれている。

本研究においては、有用物質生産を行なうための動物細胞培養技術として、ハイブリドーマやミエローマなどの浮遊性細胞を対象とした固定化培養について検討した。すなわち、浮遊性動物細胞の固定化法として、(1) active な固定化法では、アルギン酸カルシウムゲル包括固定化法について、また (2) passive な固定化法では、新たに開発した、ポリビニルホルマール樹脂多孔質体を細胞保持粒子として用いる固定化法について、active な固定化法と passive な固定化法の両面から、固定化培養の諸特性を明らかにするとともに、工業的に応用可能な技術とすることを目的に研究を行なったものである。

本論文の内容の概要を以下に述べる。

本論文は2 編6 章からなる。第1 編では、アルギン酸カルシウムゲルによる浮遊性動物細胞の包括固定化培養とその特性について述べる。本編においては、浮遊性動物細胞として、モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを使用した。

第1 章では、まず、アルギン酸カルシウムゲル粒子に包括固定化したハイブリドーマを、血清培地および無血清培地を用いて静置培養し、高密度培養の可能性やモノクローナル抗体の比生産速度におよぼす固定化の影響について検討

した。アルギン酸ゲル粒子は物理的に強固でないため、長期間培養を維持するには、ゲル粒子の特性を考慮した適切な培養槽の開発が必要である。そこで次に、培養槽底部から培地を緩やかに供給してゲル粒子を浮遊させる膨張層型培養槽を使用して、ゲル粒子に固定化したハイブリドーマの無血清培地を用いた連続培養を試み、長期間にわたるモノクローナル抗体の生産が可能なことを示した。

アルギン酸カルシウムのようなゲル粒子内に包括固定化された動物細胞の増殖に最も影響をおよぼす物質は、溶存酸素であると考えられる。そこで第2 章では、アルギン酸カルシウムゲル粒子に固定化したハイブリドーマの培養特性のなかで酸素消費に着目して、固定化細胞の比酸素消費速度を測定し、固定化していない細胞との比較検討を行なった。固定化細胞の比酸素消費速度は培養の経過とともに増加したが、この固定化細胞の比酸素消費速度の増加とゲル粒子内における細胞のコロニーの形成との関係を考察した。

第II 編では、多孔性の細胞保持粒子を用いる浮遊性動物細胞の固定化法の開発と培養特性について述べる。本編においては、浮遊性動物細胞として、ハイブリドーマ作製の際の細胞融合のパートナーであり、また最近遺伝子組換えの宿主として用いられているミエローマを使用した。

第3 章では、平均孔径が30-100 μm のポリビニルホルマール (PVF) 樹脂多孔質体を細胞保持粒子として用いるミエローマの固定化の可能性を静置培養および振とう培養において検討し、安価な合成高分子素材でできた比較的孔径の小さい多孔質体を細胞保持粒子として用いることにより、複雑な操作を要することなく容易に浮遊性動物細胞の高密度培養が達成できることを示した。

第4 章では、工業的に応用可能なバイオリアクターのプロトタイプとして、底部から直接気泡通気することにより固定化担体粒子を緩やかに循環させる循環層型培養槽を選定し、PVF 樹脂多孔質体の細胞保持粒子へのミエローマの固

定化と無血清培地を用いた培養について検討し、バイオリアクターにおいても長期にわたる高密度培養が可能であることを示した。

第5章と第6章は、細胞保持粒子に固定化した浮遊性動物細胞の増殖に着目し、その特性の把握を検討したものである。まず、第5章では、PVF樹脂多孔質体の細胞保持粒子に固定化したミエローマの静置・振とう培養を行ない、固定化細胞のMTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) 変換活性や細胞死にともない培地中に放出される乳酸脱水素酵素 (LDH) の活性を測定することにより、固定化細胞密度、保持粒子内における生細胞の分布、死滅細胞数などを推定し、固定化細胞の増殖・死滅挙動の評価を試みた。

第6章では、PVF樹脂多孔質体の細胞保持粒子に固定化したミエローマの灌流培養を行ない、固定化細胞および漏出細胞の細胞内LDH活性と培養上清のLDH活性とを測定することにより、細胞の漏出・死滅を考慮した固定化細胞の増殖過程の速度解析を行ない、固定化細胞の比増殖速度の推移を把握した。

参考文献

- 1) Birch, J.R., R. Boraston and L. Wood, *Trends Biotechnol.*, **3**, 162-166 (1985)
- 2) Klein, F. and R.T. Ricketts, *Methods Enzymol.*, **78**, 75-78 (1981)
- 3) 山崎徹, 塩田道治, 化学工学, **50**, 388-393 (1986)
- 4) Radlett, P.J., *Adv. Biochem. Eng./Biotechnol.*, **34**, 129-146 (1987)
- 5) Bebbington, C.R., G. Renner, S. Thomson, D. King, D. Abrams and G.T. Yarranton, *Bio/Technology*, **10**, 169-175 (1992)
- 6) Kaufman, R.J., L.C. Wasley, A.J. Spiliotes, S.D. Gossels, S.A. Latt, G.R. Larsen and R.M. Kay, *Mol. Cell. Biol.*, **5**, 1750-1759 (1985)
- 7) Lin, F.K., S. Suggs, C.K. Lin, J.K. Browne, R. Smalling, J.C. Egrie, K.K. Chen, G.M. Fox, F. Martin, Z. Stabinsky, S.M. Badrawi, P.H. Lai and E. Goldwasser, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**, 7580-7584 (1985)
- 8) Goto, M., K. Akai, A. Murakami, C. Hashimoto, E. Tsuda, M. Ueda, G. Kawanishi, N. Takahashi, A. Ishimoto, H. Chiba and R. Sasaki, *Bio/Technology*, **6**, 67-71 (1988)
- 9) Feder, J. and W.R. Tolbert, *Scientific American*, **248**, 24-31 (1983)
- 10) 源良樹, バイオミメティック・エンジニアリング (生体模倣工学) (化学工学協会編), さんえい出版, pp 237-264 (1988)
- 11) 角谷徹, 生命増殖工学 (山口彦之編), 裳華房, pp 191-219 (1991)
- 12) 渡嘉敷通之, 高沢美治, 濱本公彦, 醗酵工学, **65**, 535-536 (1987)
- 13) Takazawa, Y., M. Tokashiki, H. Murakami, K. Yamada and H. Omura, *Biotechnol. Bioeng.*, **31**, 168-172 (1988)
- 14) Sato, S., K. Kawamura and N. Fujiyoshi, *J. Tissue Culture Methods*, **8**, 167-171 (1983)
- 15) 渡嘉敷通之, 濱本公彦, 高沢美治, 市川弥太郎, 化学工学論文集, **14**, 337-341 (1988)
- 16) Hamamoto, K., K. Ishimaru and M. Tokashiki, *J. Ferment. Bioeng.*, **67**, 190-194 (1989)
- 17) Nakashima, T., H. Fukuda, S. Kyotani and H. Morikawa, *J. Ferment. Technol.*, **66**, 441-448 (1988)
- 18) Lee, G.M. and B.O. Palsson, *Biotechnol. Bioeng.*, **36**, 1049-1055 (1990)
- 19) Lee, G.M., A. Varma and B.O. Palsson, *Biotechnol. Bioeng.*, **38**, 821-830 (1991)
- 20) Chang, H.N. and M. Moo-Young, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **29**, 107-112 (1988)

- 21) 橋本健治, 白井義人, 固定化細胞 (田中渥夫編著), 講談社サイエンスフィック, pp 1-80 (1992)
- 22) Köhler, G. and C. Milstein, *Nature*, **256**, 495-497 (1975)
- 23) Nilsson, K., W. Scheirer, O.W. Merten, L. Östberg, E. Lichl, H.W.D. Katinger and K. Mosbach, *Nature*, **302**, 629-630 (1983)
- 24) Shirai, Y., K. Hashimoto, H. Yamaji and M. Tokashiki, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **26**, 495-499 (1987)
- 25) Shirai, Y., R. Sasaki, K. Hashimoto, H. Kawahara, K. Hitomi and H. Chiba, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **29**, 544-549 (1988)
- 26) Shirai, Y. and K. Hashimoto, *J. Ferment. Bioeng.*, **68**, 264-268 (1989)
- 27) Iijima, S., T. Mano, M. Taniguchi and T. Kobayashi, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **28**, 572-576 (1988)
- 28) Yoshida, H., M. Kamihira, S. Iijima and T. Kobayashi, *J. Chem. Eng. Jpn*, **22**, 282-286 (1989)
- 29) Mano, T., S. Mitsuda, E. Kumazawa and Y. Takeshita, *J. Ferment. Bioeng.*, **73**, 486-489 (1992)
- 30) Kamihira, M., J. Wang, M. Hata, S. Iijima and T. Kobayashi, *J. Ferment. Bioeng.*, **75**, 138-144 (1993)
- 31) Lim, F. and A.M. Sun, *Science*, **210**, 908-910 (1980)
- 32) Posillico, E.G., *Bio/Technology*, **4**, 114-117 (1986)
- 33) Yoshioka, T., R. Hirano, T. Shioya and M. Kato, *Biotechnol. Bioeng.*, **35**, 66-72 (1990)
- 34) Altshuler, G.L., D.M. Dzielwulski, J.A. Soweck and G. Belfort, *Biotechnol. Bioeng.*, **28**, 646-658 (1986)
- 35) Atkinson, B., G.M. Black, P.J.S. Lewis and A. Pinches, *Biotechnol. Bioeng.*, **21**, 193-200 (1979)
- 36) Cooper, P.F., I. Walker, H.E. Crabtree and R.P. Aldred, in *Process engineering aspects of immobilised cell systems* (C. Webb, G.M. Black and B. Atkinson, eds), The Institution of Chemical Engineers, Rugby, UK, pp 205-217 (1986)
- 37) Fynn, G.H. and T.N. Whitmore, *Biotechnol. Lett.*, **4**, 577-582 (1982)
- 38) Oriel, P., *Biotechnol. Lett.*, **10**, 113-116 (1988)
- 39) Black, G.M., C. Webb, M. Matthews and B. Atkinson, *Biotechnol. Bioeng.*, **26**, 134-141 (1984)
- 40) Park, C-H., M.R. Okos and P.C. Wankat, *Biotechnol. Bioeng.*, **34**, 18-29 (1989)
- 41) Webb, C., H. Fukuda and B. Atkinson, *Biotechnol. Bioeng.*, **28**, 41-50 (1986)
- 42) Fukuda, H. and H. Morikawa, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **27**, 15-20 (1987)
- 43) Kautola, H. and Y-Y. Linko, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **31**, 448-452 (1989)
- 44) Capdevila, C., Corrieu, G. and M. Asther, *J. Ferment. Bioeng.*, **68**, 60-63 (1989)
- 45) Kobayashi, T., K. Tachi, T. Nagamune and I. Endo, *J. Chem. Eng. Jpn*, **23**, 408-413 (1990)
- 46) Baillicz, C., C. Largeau, E. Casadevall, L.W. Yang and C. Berkaloff, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **29**, 141-147 (1988)
- 47) Armentia, H. and C. Webb, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **36**, 697-700 (1992)
- 48) Lindsey, K., M.M. Ycoman, G.M. Black and F. Mavituna, *FEBS Lett.*, **155**, 143-149 (1983)
- 49) Rhodes, M.J.C. and B.H. Kirsop, *Biologist*, **29**, 134-140 (1982)

- 50) Koge, K., Y. Orihara and T. Furuya, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **36**, 452-455 (1992)
- 51) Nilsson, K., F. Buzsaky and K. Mosbach, *Bio/Technology*, **4**, 989-990 (1986)
- 52) Matsushita, T., M. Ketayama, K. Kamihata and K. Funatsu, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **33**, 287-290 (1990)
- 53) Ogawa, T., M. Kamihira, S. Terashima, K. Yasuda, S. Iijima and T. Kobayashi, *J. Ferment. Bioeng.*, **74**, 27-31 (1992)
- 54) Hayman, E.G., N.G. Ray and P.W. Runstadler, Jr., in *Bioreactors and biotransformations* (G.W. Moody and P.B. Baker, eds), Elsevier, London, pp 132-140 (1987)
- 55) Yamaji, H., H. Fukuda, Y. Nojima and C. Webb, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **33**, 609-613 (1989)
- 56) Yamaji, H. and H. Fukuda, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **34**, 730-734 (1991)
- 57) Yanagi, K., S. Mizuno and N. Ohshima, *Trans. Am. Soc. Artif. Intern. Organs*, **36**, M727-M729 (1990)
- 58) Yanagi, K., H. Miyoshi, H. Fukuda, and N. Ohshima, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **37**, 316-320 (1992)
- 59) 寺嶋修司, 小川達也, 上平正道, 安田公昭, 飯島信司, 小林猛, 生物工学会誌, **71**, 165-170 (1993)
- 60) Murdin, A.D., J.S. Thorpe, D.J. Groves and R.E. Spier, *Enzyme Microb. Technol.*, **11**, 341-346 (1989)
- 61) Racher, A.J., D. Looby and J.B. Griffiths, *J. Biotechnol.*, **15**, 129-145 (1990)
- 62) Kurosawa, H., H. Märkl, C. Niebuhr-Redder and M. Matsumura, *J. Ferment. Bioeng.*, **72**, 41-45 (1991)

第1編 アルギン酸カルシウムゲルによるハイブリドーマの包括固定化と培養特性

第1章 膨張層型培養槽における固定化ハイブリドーマの培養とモノクローナル抗体生産

1. 1 緒言

海藻から抽出される酸性多糖類であるアルギン酸は、ナトリウム塩としては水に可溶であるが、カルシウムイオンなどの多価のカチオンと接触すると容易にゲル化する。アガロースも海藻起源の多糖類で、加温すると水に溶解するが冷却するとゲル化が起こる。このようなゲル化反応の際に細胞を共存させると、細胞は温和な条件の下で無害なゲルのマトリックス内に包括固定化される。したがって、これらの天然の多糖類を用いるゲル包括法は、生育可能な環境条件の許容範囲が狭くまた毒性の物質に対してきわめて敏感な動物細胞に適した固定化法であると考えられ、ハイブリドーマなどの浮遊性動物細胞への適用が検討されている^{1,2,3)}。

海藻起源の多糖類のゲル粒子は物理的に強固でないため、これらのゲルに動物細胞を包括固定化して長期間培養を行なうためには、ゲル粒子の特性を考慮した適切なバイオリアクターを開発することが必要である。たとえば、攪拌槽型や充填層型のバイオリアクターにおいて、ゲル粒子に過度の機械的な衝撃力が加わるような操作を行なうと、ゲル粒子は破壊されてしまい長期的な培養は困難になると考えられる。Himmeler ら⁴⁾は、ドラフトチューブの内側でプロペラ型の攪拌羽根 (marine impeller) を緩やかに回転することによりドラフトチューブのまわりで培地とゲル粒子を循環させる気泡塔型の培養槽を開発し、ハイブリドーマを固定化したアガロースゲル粒子が破壊されることなく 40 日間にわ

たってモノクローナル抗体の生産が可能であったことを報告している。一方、アルギン酸ゲルへの包括法は、固定化の操作が簡単であるため、有用物質生産を行なうための固定化培養法として工業化が可能なポテンシャルをもっていると考えられるが、動物細胞を固定化して長期間培養できるようなバイオリアクターの開発に関する報告は行なわれていない。

本章では、まず、アルギン酸カルシウムゲル粒子に包括固定化したハイブリドーマを、血清培地および無血清培地を用いて静置培養し、高密度培養の可能性とモノクローナル抗体の比生産速度におよぼす固定化の影響とを検討した。次に、ゲル粒子の破損を防止するために培養槽底部から培地を緩やかに供給してゲル粒子を浮遊させる膨張層型培養槽を使用して、アルギン酸カルシウムゲルに包括固定化したハイブリドーマを無血清培地を用いて培養し、モノクローナル抗体の連続生産を試みた。

1. 2 実験

1. 2. 1 細胞と培地

細胞は、浮遊性細胞であるマウス-ヒトハイブリドーマ 4H11 を使用した。4H11 株は、*Pseudomonas* sp. に対する IgA クラスの抗体を産生している敗血症患者の末梢血由来の B 細胞とマウスミエローマ P3-X63-Ag8-U1 を細胞融合することにより得られたものである⁵⁾。本細胞株は帝人(株)において樹立された。

培地は、基本合成培地として RPMI 1640 培地 (Gibco)、ダルベッコ変法イーグル培地 (DME) (日水製薬)、ハム F12 培地 (日水製薬) を 2:1:1 の比で混合した RDF 培地⁶⁾ (RPMI 1640, 5.46 g/l; DME, 2.62 g/l; F12, 2.78g/l) に、 NaHCO_3 を 1.05 g/l、HEPES (*N*-(2-hydroxyethyl)piperazine-*N'*-(2-ethane sulphonic acid)) (同仁化学研究所) を 0.36 g/l、ペニシリン G カリウム (明治製薬) を 10^5 units/l、硫酸ストレプトマイシン (明治製薬) を 0.1 g unit/l 添加したものを使用した。血清

培地では、これに牛胎児血清を 100 ml/l 添加した。無血清培地としては、ITES⁷⁾ (インスリン (Novo), 10 mg/l; トランスフェリン (Sigma), 20 mg/l; エタノールアミン, 20 $\mu\text{mol/l}$; 亜セレン酸ナトリウム, 1 nmol/l), および牛血清アルブミン (和光純薬工業) を 5 g/l の濃度で添加したものを使用した。

1. 2. 2 アルギン酸カルシウムゲルへの包括固定化

アルギン酸カルシウムゲルへの細胞の包括固定化は、次の手順で行なった。

(1) 遠心分離により培養上清を除去し新たに少量の新鮮培地を加えることにより細胞密度を高めた細胞懸濁培地と、121°C で 20 min オートクレーブすることにより滅菌した 2% アルギン酸ナトリウム水溶液を 1:1 の比で混合し、シリンジに充填した。(2) 直ちに氷水中で冷却した 0.1 M CaCl_2 水溶液に滴下した。この際、シリンジの針を CaCl_2 水溶液を入れたビーカーの端に繰返し打ちつけることにより、直径 2 mm の均一な大きさのゲル粒子を得た。(3) ゲル粒子をそのまま CaCl_2 水溶液中で 1 h 放置し、ゲル化反応を完結させた。(4) CaCl_2 水溶液を除去し、ゲル粒子を新鮮培地で数回洗浄した。(5) ゲル粒子をペトリディッシュに移し、新鮮培地を加え、 CO_2 インキュベーター (5% CO_2 , 37°C) 内で静置培養を行なった。

1. 2. 3 固定化細胞の静置培養

固定化が細胞のモノクローナル抗体の生産におよぼす影響を調べるために、細胞を固定化したゲル粒子 0.7 g を直径 35 mm のペトリディッシュに移し、2 ml の新鮮培地を加え、 CO_2 インキュベーター内で静置培養を行なった。培養 9 日目までは毎日培地を全量新鮮培地と交換し、それ以降は 1 日に 2 回培地交換を行なった。また、培養 32 日目までは血清培地を使用し、それ以降は無血清培地を使用した。培地交換の際に除去した培養液中の IgA 濃度を測定することに

より固定化細胞の IgA 生産速度を求め、固定化していない細胞のそれと比較した。

1. 2. 4 膨張層型培養槽における固定化細胞の培養

培養装置として、Fig. 1.1 に示すように膨張層型培養槽と気泡塔から構成されるシステムを使用した。アルギン酸カルシウムゲル粒子に固定化した細胞を CO₂ インキュベーター内で 6 日間前培養した後、ゲル粒子 4 g を膨張層型培養槽内に充填した。培地は無血清培地を使用し、培養槽と気泡塔の間で培地をペリスタルティックポンプを用いて循環させた。膨張層型培養槽における培地の線速度は 3.0 cm/min で、ゲル粒子の破壊を防ぐためにゲル粒子の最少流動化速度よりもわずかに大きい速度とした。気泡塔には、孔径 0.2 μm のメンブレンフィルターを通してろ過滅菌したガス (95% 空気, 5% CO₂) を 15 ml/min の速度でバブリングし、培養系内に酸素を供給した。培養系内の全培地量は 36.5 ml であった。また、培養槽と気泡塔を恒温水槽内に保持することで、培養系内の温度を 37℃ で一定に維持した。培地の交換は、2 h 毎にペリスタルティックポンプを作動させ、新鮮培地の供給と使用済み培地の除去を同時に等速度で行なうことにより実施し、系内の培養液中のグルコース濃度をほぼ 1.5 mM に維持した。

1. 2. 5 分析方法

固定化していない細胞の生細胞密度は、細胞懸濁培地に 0.5% トリパンブルー溶液を 2:1 の比で加えた後、未染色細胞を顕微鏡下 Burker Turk 型血球計算板にて計数することにより測定した。ゲル粒子内の細胞数は、ゲル粒子を 1% クエン酸ナトリウム水溶液に浸漬して溶解した後、同様に生細胞数を計数することにより測定した。培養液中の IgA 濃度は ELISA (Enzyme-linked

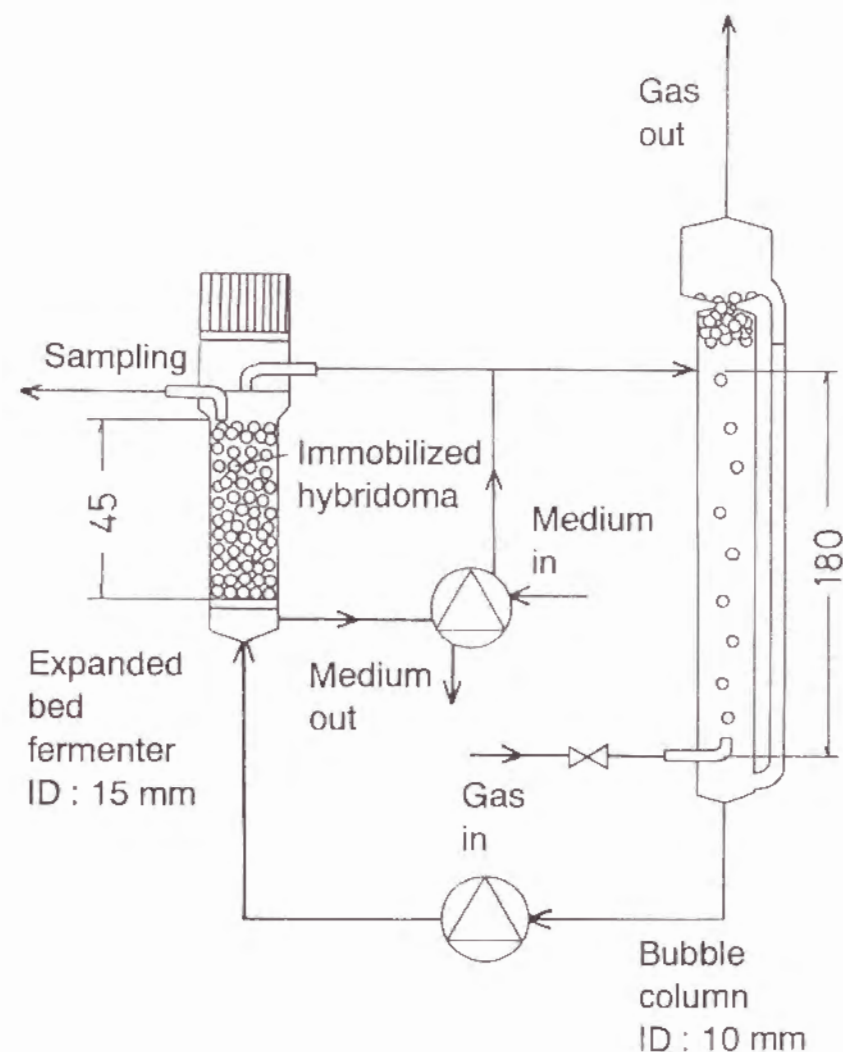


Fig. 1.1. Schematic diagram of the expanded bed fermenter system

immunosorbent assay) 法により測定した。

1. 3 結果と考察

1. 3. 1 固定化細胞の静置培養

1% アルギン酸カルシウムゲル粒子に固定化した 4H11 をディッシュ内で静置培養したが、その際の細胞の増殖曲線と IgA 生産速度の経時変化を Fig. 1.2 に示す。図にみられるように、ゲル粒子内に固定化された細胞は、培養初期において倍增時間 2.8 d で指数関数的に増殖した後、培養 13 日目には細胞密度は 1×10^7 cells/cm³-gel 達した。固定化細胞密度はその後安定に保たれ、27 日間低下しなかった。また、細胞の分泌した IgA は、アルギン酸カルシウムゲル粒子

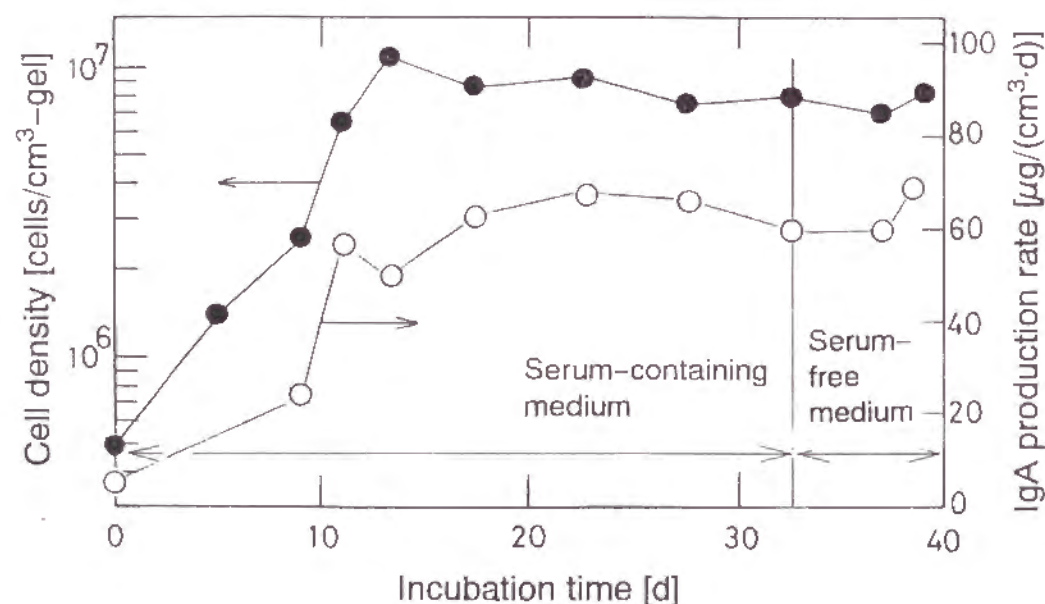


Fig. 1.2. Hybridoma cell growth in the gel particles and monoclonal antibody (IgA) production in static culture

内を拡散し、培地中に産生されることがわかる。

培養途中のゲル粒子を顕微鏡下において観察すると、培養開始時には細胞はゲル粒子内に均一に点在していたが、培養 7 日目にはゲル粒子の中心から表面に向けて細長いラグビーボール状のコロニーを形成し、培養時間が経過するにつれてコロニーが肥大化していくのがみられた⁸⁾。

次に、固定化細胞の IgA の比生産速度の経時変化を、Fig. 1.3 に示す。固定化していない 4H11 の無血清培地を用いる静置培養下における IgA の比生産速度は、 $28 \mu\text{g}/(\text{d} \cdot (10^6 \text{ cells}))$ であった。Fig. 1.3 では、固定化細胞の比 IgA 生産速度を、固定化していない細胞のそれとの比 (固定化細胞の比 IgA 生産速度 / 固定化していない細胞の比 IgA 生産速度) で表示している。図から明らかなように、

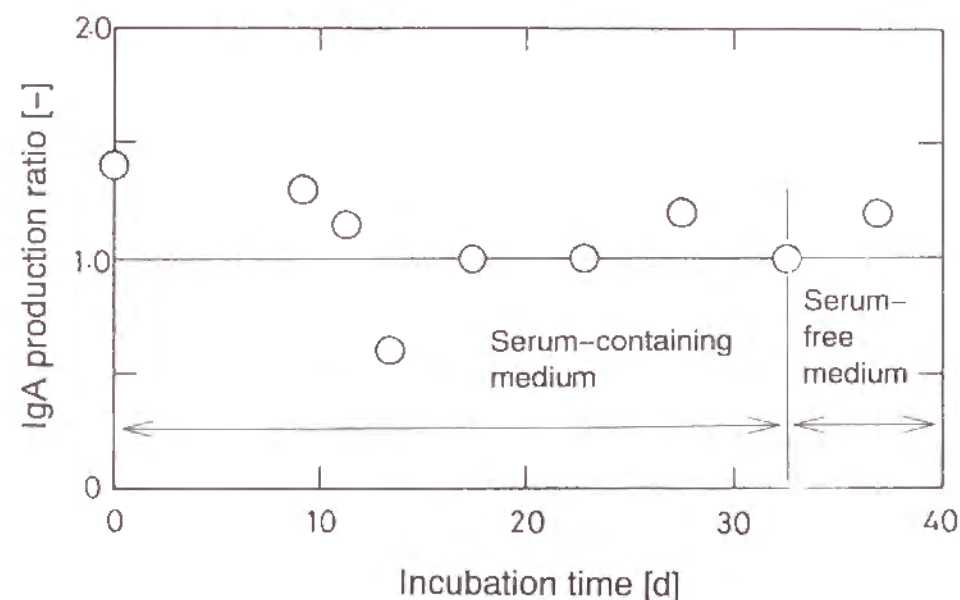


Fig. 1.3. Comparison of specific IgA production rate in immobilized and non-immobilized 4H11 cells. The ratio of specific IgA production rate of immobilized cells to that of non-immobilized cells is plotted against the incubation time.

IgA の比生産速度の比は培養期間を通してほぼ1であり、1% アルギン酸カルシウムゲルへの包括固定化は細胞の IgA 生産に影響をおよぼさないことがわかる。また、培養 32 日目に培地を血清培地から無血清培地に切りかえたが、Fig. 1.2 および 1.3 にみられるように、固定化細胞密度および固定化細胞の IgA 生産性は、いずれも培地の違いにより影響を受けないことがわかる。

近年、無血清培地の開発が進み、多くの細胞株が無血清下で培養可能となっている。無血清培地の使用は、(1) 培地のコストを安くできる、(2) ロットによるばらつきがない、(3) 生産物の分離精製が容易になる、などの利点をもつ。このため、動物細胞培養による有用物質生産を工業的規模で行なうには、無血清培地の使用が好ましい。ここでは、ハイブリドーマをアルギン酸カルシウムゲルに包括固定化しても細胞のモノクローナル抗体の生産性に変化が無いこと、および固定化細胞を無血清培地を用いて培養しても細胞の抗体生産性は変わらないことを確認した。

1. 3. 2 膨張層型培養槽における連続培養

膨張層型培養槽における固定化細胞の培養結果を、Fig. 1.4 に示す。図にみられるように、ゲル粒子に固定化された細胞は、培養 9 日目まで指数関数的に増殖した後、培養 12 日目にはゲル粒子内の細胞密度は 2.7×10^7 cells/cm³-gel 達した。その後、約 40 日間、 1×10^7 cells/cm³-gel 以上の高い固定化細胞密度と高い IgA 生産性を維持できた。しかし、培養 49 日目には固定化細胞密度は著しく低下した。

動物細胞は通常その増殖速度や有用物質生産速度がきわめて小さいため、動物細胞培養による有用物質生産においては、細胞の増殖に要する時間よりも十分長い時間にわたって細胞を高密度状態に維持し、有用物質を継続的に産生させることが望ましい。Himmler ら⁴⁾ は、アガロースゲルに固定化したハイブリ

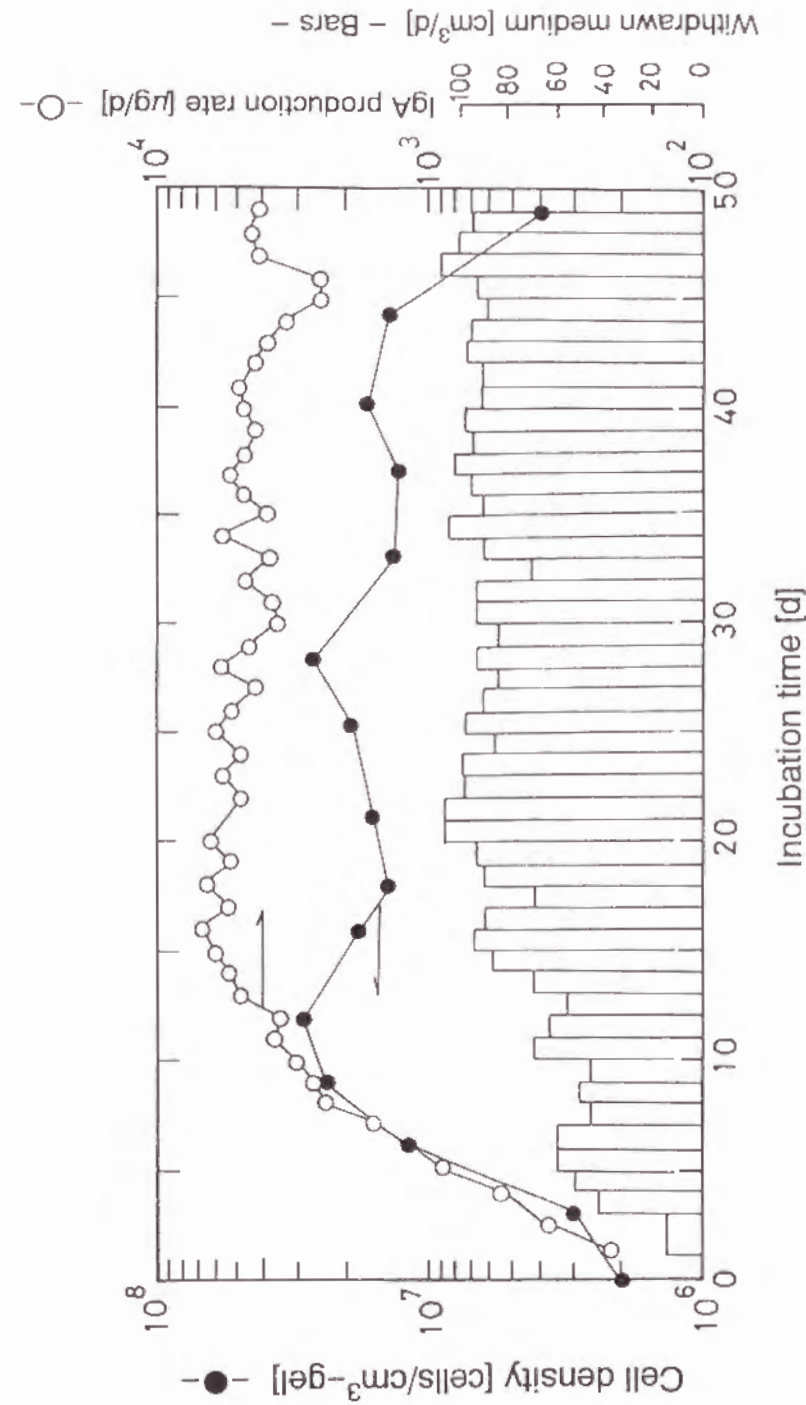


Fig. 1.4. Hybridoma cell growth in gel particles and monoclonal antibody production in the expanded bed fermenter

ドーマを気泡塔型の培養槽を用いて培養し、ゲル粒子が破壊されることなく 40 日間にわたってモノクローナル抗体の生産が可能であったことを報告している。彼らはあらかじめ細胞を高密度でアガロースゲルに固定化したが、ゲル内の細胞密度はほとんど増加していない。本検討においては、細胞をアルギン酸ゲルに 1×10^6 cells/cm³-gel 程度の密度で固定化し、細胞密度を約 10 倍に高めた後、全培養期間の 80% 以上の長時間にわたって 1×10^7 cells/cm³-gel 以上の高細胞密度を維持したままモノクローナル抗体を生産することができた。

しかしながら、回収した培地中の IgA 濃度は、数十 μ g/ml と低いものであった。これは、培養系内においてゲル粒子の占める体積の割合が 10% 程度と小さいためである。本実験系では、系内の全培地のうち気泡塔内の培地の占める割合が大きいものとなっている。空気の代わりに酸素を通気したり、水の 10 倍以上の酸素溶解度を有する液状フルオロカーボンを用いるなど、酸素供給能力のより高い方法を用いることにより、気泡塔などの酸素供給部分の容積を小さくできれば、回収した培地中の抗体濃度を高めることが可能になるものと思われる。

1. 3. 3 ゲル構造の保持と細胞の漏出

アルギン酸ゲルはそのマトリックス構造を維持するのにカルシウムイオンなどの多価のカチオンを必要とする。アルギン酸ゲルに固定化した微生物の培養では培地中にカルシウムイオンを高濃度で含む場合が多いため、ゲル構造は強固なまま維持される。動物細胞培養用の培地は細胞の生育にとって必須であるリン酸イオンを含んでいるが、リン酸イオンはカルシウムイオンと結合し沈殿を生じるため、カルシウムイオンを培地に高濃度で添加することはできない。さらに、リン酸イオンはアルギン酸カルシウムゲルのカルシウムと結合しこれを取り除く作用がある。このため、動物細胞をアルギン酸カルシウムゲルに固

定化して培養する場合、培養時間の経過とともにゲルが軟化するという欠点がある。

しかし本検討においては、膨張層型培養槽における約 50 日間の固定化培養の終了時においても、ゲル粒子の破損はまったく認められなかった。本検討で用いた培養システムでは、ゲル粒子に固定化された細胞を培養する培養槽と培養系に酸素の供給を行なう気泡塔とを分離している。さらに、培養槽内において培地を供給する線速度をゲル粒子の最小流動化速度よりもわずかに大きい速度とし、ゲル粒子を緩やかな流動状態に保った。このような状態ではゲル粒子にほとんど剪断応力がかからないため、ゲル粒子の強度が調製時のそれに比べてしだいに小さくなっていくにもかかわらず、ゲル粒子の破損を防ぐことができたものと考えられる。

ゲル粒子の破損は起こらなかったが、培養時間が経過するにともない細胞のゲル粒子からの漏出が認められた。すなわち、培養 10 日目までは回収した培地中に細胞はほとんどみられなかったが、培養 16 日目には回収した培地中に 4×10^4 cells/cm³ の密度で細胞が漏出していた。培養 19 日目には培養槽内のデッドスペースに細胞の蓄積がみられ、漏出細胞密度も 1×10^5 cells/cm³ に達した。Fig. 1.4 にみられるように、固定化細胞密度は培養 49 日目において大きく低下しているにもかかわらず、IgA の生産速度はあまり変化していない。この現象は、ゲル粒子から漏出し培養槽内に蓄積している細胞が IgA 生産に寄与しているために起こったものと思われる。

アガロースゲル粒子に固定化したハイブリドーマの気泡塔型培養槽を用いた培養においても、最高 1×10^6 cells/cm³ 程度の細胞の漏出が報告されている⁴⁾。この場合ゲル粒子を培地中で流動させているため、細胞の漏出が著しくなったものと思われる。これに対し、膨張層型培養槽ではゲル粒子にほとんど剪断応力がかからないため、ゲル粒子の破損を防ぐことができるのみならず、細胞の

漏出量も比較的少なくできるものと思われる。

以上に述べたように、アルギン酸カルシウムゲルへのハイブリドーマの包括固定化は、細胞のモノクローナル抗体の生産性に対して悪影響をおよぼすことがなく、 1×10^7 cells/cm³-gel 以上の高密度培養が達成可能であった。培養の経過とともにゲル粒子の強度がしだいに小さくなっていく欠点があるが、膨張層型培養槽を用いることによりゲル粒子が破壊されることなく長期にわたる高密度培養とモノクローナル抗体の生産が可能であった。したがって、アルギン酸カルシウムゲルへの包括法と膨張層型培養槽による固定化培養システムは、有用物質生産を行なうための固定化培養法として優れた方法の一つであると思われる。

1. 4 結論

マウスーヒトハイブリドーマ 4H11 をアルギン酸カルシウムゲル粒子に包括固定化し、血清培地および無血清培地を使用した静置培養を行なった。その結果、いずれの培地を使用しても、ゲル粒子内の細胞密度が 1×10^7 cells/cm³-gel 程度の高密度培養が達成できること、および細胞のモノクローナル抗体の比生産速度が固定化により影響されないことを確認した。

次に、培養槽底部から培地を緩やかに供給する膨張層型培養槽に、細胞を固定化したゲル粒子を充填して、無血清培地を用いた連続培養を行ない、ゲル粒子が破壊されることなく 40 日間にわたって 1×10^7 cells/cm³-gel 以上の高密度培養とモノクローナル抗体の生産が可能であることを明らかにした。

参考文献

- 1) Nilsson, K. and K. Mosbach, *FEBS Lett*, **118**, 145-150 (1980)
- 2) Nilsson, K., S. Birnbaum, S. Flygare, L. Linse, U. Schröder, U. Jeppson, P-O.

Larsson, K. Mosbach and P. Broderius, *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **17**, 319-326 (1983)

- 3) Nilsson, K., W. Scheirer, O.W. Merten, L. Österberg, E. Liehl, H.W.D. Katinger and K. Mosbach, *Nature*, **302**, 629-630 (1983)
- 4) Himmler, G., G. Parfi, F.Rücker, H. Katinger and W. Scheirer, *Develop. Biol. Standard*, **60**, 291-296 (1984)
- 5) Takazawa, Y., M. Tokashiki, H. Murakami, K. Yamada and H. Omura, *Biotechnol. Bioeng.*, **31**, 168-172 (1988)
- 6) 村上浩樹, 無血清細胞培養マニュアル (大野忠夫・村上浩樹編), 講談社サイエンティフィック, pp 14-30 (1989)
- 7) Murakami, H., H. Masui, G.H. Sato, N. Sucoka, T.P. Chow, T. Kano-Sucoka, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 1158-1162 (1982)
- 8) Hashimoto, K. and Y. Shirai, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **613**, 216-226 (1990)

第2章 固定化ハイブリドーマの酸素消費速度

2. 1 緒言

前章では、ハイブリドーマを固定化したアルギン酸カルシウムゲル粒子を膨張層型培養槽に充填し、無血清培地を用いた連続培養を行ない、ゲル粒子が破壊されることなく40日間以上にわたって 1×10^7 cells/cm³-gel 以上の高密度培養とモノクローナル抗体の生産が可能であることを確認した。

動物細胞をゲル粒子に包括固定化して培養すると、培地中の栄養分や溶存酸素はゲル粒子の表面から供給され、粒子内の細胞により消費されつつ粒子中心へと拡散していく。ゲル粒子内の細胞は拡散してきた栄養分や酸素を消費することにより粒子内で増殖する。ゲル粒子の表面近傍の細胞の増殖にともないゲル粒子の中心付近では栄養分や酸素の不足が起こり、やがて粒子の中心付近の細胞は死滅していくものと思われる。このためゲル粒子の粒径をいらずに大きくすると、ゲル粒子内で生細胞によって占められる体積の割合は低下すると考えられる。

動物細胞培養において、培地中の飽和溶存酸素濃度は約7 ppmであり、きわめて低い。動物細胞の比酸素消費速度は、微生物に比べると1オーダー小さいものの、グルコースなどの栄養分の比消費速度に比べると格段に大きい。したがって、ゲル粒子内における固定化細胞の増殖に最も影響をおよぼす物質は溶存酸素であると考えられる¹⁾。このため、固定化細胞の酸素消費速度を測定しその特性を把握しておくことは、合理的なバイオリアクターの設計や最適な操作を行なうために不可欠であると思われる。

固定化微生物の酸素消費速度の測定に関しては既に報告がなされているが²⁾、固定化動物細胞の酸素消費速度に関する報告はほとんどなされていない。そこで本章では、アルギン酸カルシウムゲル粒子に包括固定化したハイブリドーマ

の比酸素消費速度を測定し、固定化していない細胞との比較を行なうとともにその特性の解明を試みた。

2. 2 実験

2. 2. 1 細胞と培地

細胞は、浮遊性細胞であるマウス-ヒトハイブリドーマ4H11およびマウス-マウスハイブリドーマ4C10B6³⁾を使用した。4H11株はIgAクラスのヒト型モノクローナル抗体を産生し(1. 2. 1参照)、4C10B6株は*Pseudomonas aeruginosa* strain 97のリポ多糖に対するIgG2bクラスのマウス型モノクローナル抗体を産生する。これらの細胞株は、いずれも帝人(株)において樹立されたものである。

培地は、基本合成培地としてRPMI 1640培地、ダルベッコ変法イーグル培地(DME)、ハムF12培地を2:1:1の比で混合したRDF培地(RPMI 1640, 5.46 g/l; DME, 2.62 g/l; F12, 2.78g/l)に、NaHCO₃を1.05 g/l, HEPES (N-(2-hydroxyethyl)piperazine-N'-(2-ethane sulphonic acid))を0.36 g/l, ペニシリンを10⁵ units/l, ストレプトマイシンを0.1 g unit/l, ITES (インスリン, 10 mg/l; トランスフェリン, 20 mg/l; エタノールアミン, 20 μmol/l; 亜セレン酸ナトリウム, 1 nmol/l), および牛血清アルブミンを5 g/l添加した無血清培地を用いた。4C10B6の培養には、牛血清アルブミンを添加していない培地を使用した。

2. 2. 2 固定化細胞の培養

前章(1. 2. 2)で述べた方法にしたがい、細胞懸濁培地とアルギン酸ナトリウム水溶液を混合したものをシリンジを用いてCaCl₂水溶液に滴下することにより、4H11を包括固定化した直径3 mmの1%アルギン酸カルシウムゲル粒子および4C10B6を固定化した直径2 mmのゲル粒子を調製した。ゲル粒子4 g

を直径 90 mm のペトリディッシュに移し、15 ml の新鮮培地を加え、CO₂ インキュベーター内 (5% CO₂, 37°C) で静置培養を行なった。培地は毎日全量を新鮮培地と交換した。培養中適宜、ペトリディッシュを 1 枚ずつサンプリングし、次節 (2. 2. 3) に述べる方法により固定化細胞の酸素消費速度を測定した。

また、直径 2 mm のゲル粒子に包括固定化した 4H11 を、Fig. 2.1 に示す培養

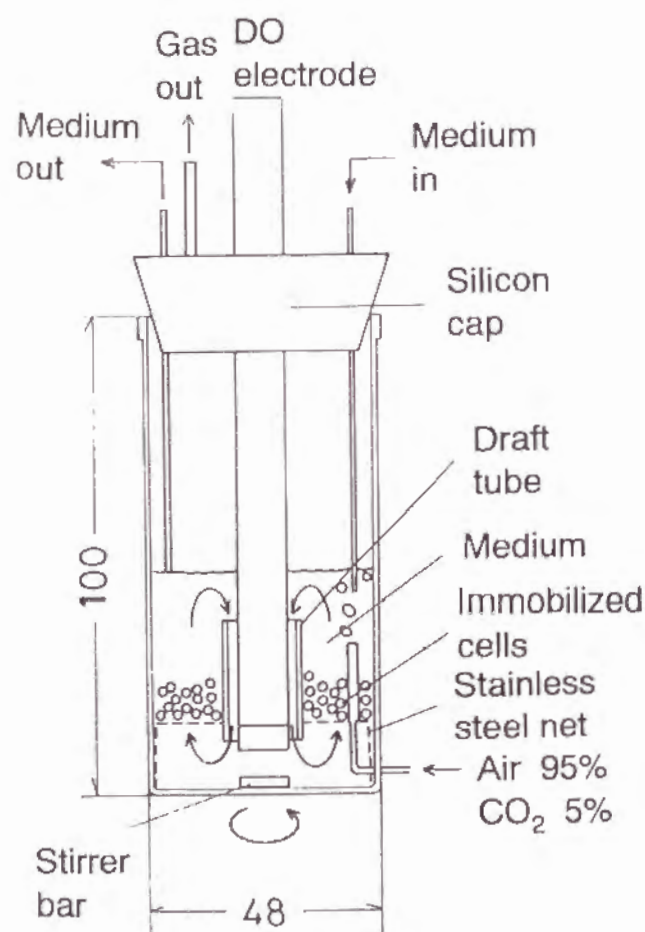


Fig. 2.1. A fermenter for cultivation of the immobilized cells. The medium is mixed with a magnetic stirrer and circulated around a draft tube without gel destruction

槽内で培養した。培地の攪拌は、ゲル粒子を破壊しないように、槽底部でマグネティックスターラーにより攪拌子を回転し槽内のドラフトチューブのまわりで培地を循環させることにより行なった。孔径 0.2 μ m のメンブレンフィルターを通してろ過滅菌したガス (95% 空気, 5% CO₂) をゲル粒子と接触しないように培養槽上部でバブリングし、培養液に酸素を供給した。培養液中のグルコース濃度および溶存酸素濃度 (Dissolved oxygen, DO) をそれぞれグルコスタット法⁴⁾ および溶存酸素電極 (オリエンタル電気) により測定しながら、培地とガスの供給速度を調節することにより、グルコース濃度を 5 mM, DO を 4 ppm に維持した。適当な固定化細胞密度となったところでゲル粒子を取り出し、固定化細胞の酸素消費速度を測定した。

2. 2. 3 酸素消費速度の測定

固定化していない細胞の酸素消費速度を、Fig. 2.2a に示す装置を用いて測定した。この装置はガラス製の容器に溶存酸素電極を装着したもので、5.5 ml の細胞懸濁培地を密封し、ガラスコーティングした攪拌子をマグネティックスターラーにて回転することにより攪拌を行なう。細胞懸濁培地は、静置培養中の固定化していない細胞を含む培地を遠心分離して古い培地を除去し、新鮮培地を加えて細胞密度を $1-2 \times 10^6$ cells/cm³ に調整した後に容器内に充填した。細胞懸濁培地を容器に充填した後直ちに測定装置を 37°C の恒温水槽中に入れ、DO の経時変化を測定した。酸素消費速度の測定後、細胞懸濁培地の生細胞密度を測定し、酸素消費速度の測定中に細胞の死滅が起こっていないことを確認した。

また、固定化細胞の酸素消費速度を、Fig. 2.2b に示す装置を用いて測定した。この装置は Fig. 2.1 に示した培養槽と同様にドラフトチューブを備え、ドラフトチューブのまわりで培地を循環させることによりゲル粒子を破壊しないように培地の攪拌を行なうものである。細胞を固定化したゲル粒子約 3 g をステンレス

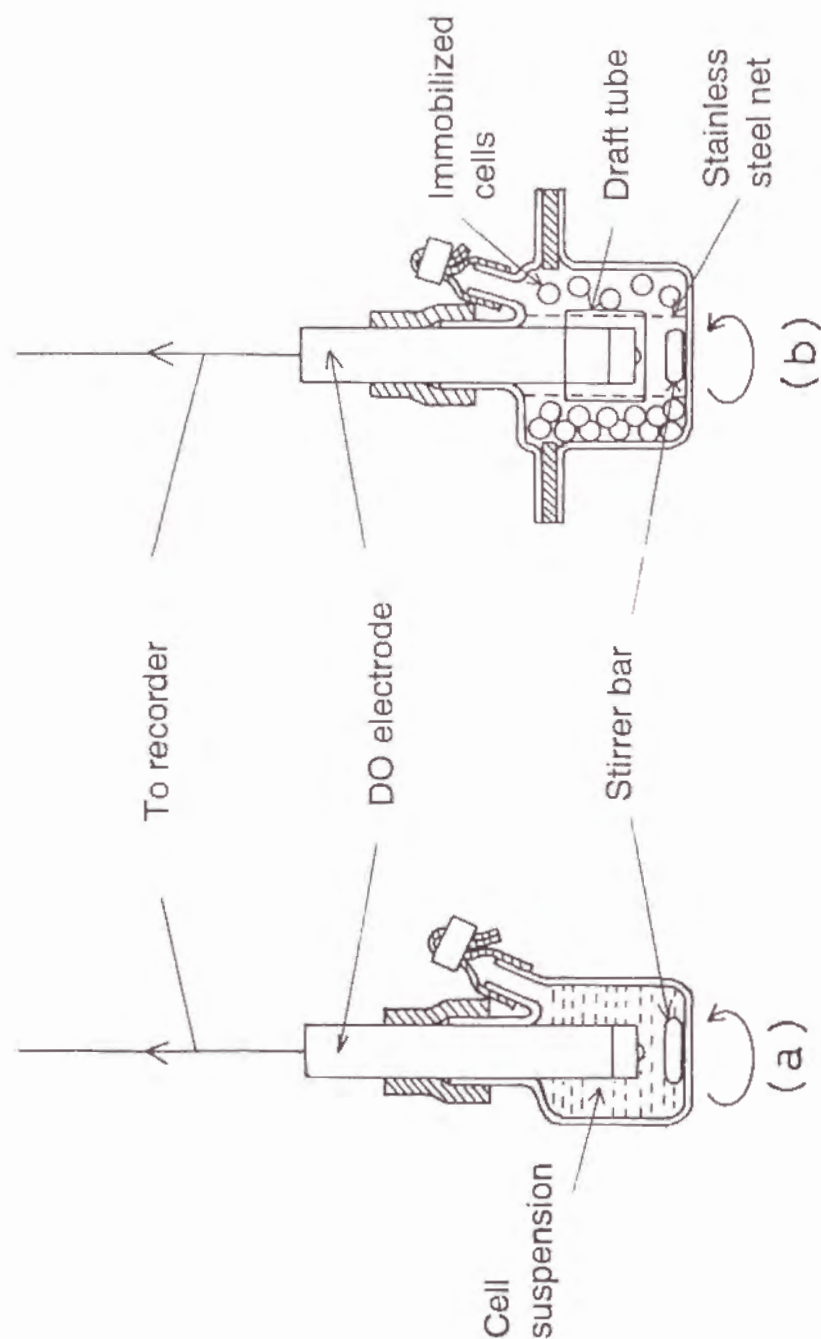


Fig. 2.2a, b. Vessels for measurement of the oxygen uptake rate. (a) Non-immobilized cells. (b) Immobilized hybridoma cells

製の金網の外側の部分に充填した後、新鮮培地を加えて容器を密封し、上で述べたのと同様の方法で DO の経時変化を測定した。容器内に充填できる培地とゲル粒子の体積の合計は 12.3 cm^3 であった。酸素消費速度の測定後、ゲル粒子の表面に付着した培地をろ紙でぬぐいゲル粒子の重量を測定した。また、後述 (2. 2. 5) のようにゲル粒子を溶解して細胞を計数することにより、固定化生細胞密度を測定した。この固定化細胞密度の測定は、酸素消費速度の測定の前後 2 回行なった。

2. 2. 4 固定化細胞のグルコース消費速度と乳酸生産速度の測定

4H11 を包括固定化した直径 3 mm のアルギン酸カルシウムゲル粒子 2.3 g を直径 60 mm のペトリディッシュに移し、新鮮培地を 7 ml 加え、 CO_2 インキュベーター内 (5% CO_2 , 37°C) で静置培養を行なった。培地は 1 日に 2 回全量を新鮮培地と交換した。培地中のグルコースおよび乳酸の濃度変化と固定化細胞密度から、固定化細胞の比グルコース消費速度と比乳酸生産速度を算出した。

2. 2. 5 分析方法

固定化していない細胞の生細胞密度は、細胞懸濁培地に 0.5% トリパンプブルー溶液を 2:1 の比で加えた後、未染色細胞を顕微鏡下 Burker Turk 型血球計算板にて計数することにより測定した。ゲル粒子内の生細胞数は、ゲル粒子を 1% クエン酸ナトリウム水溶液に浸漬して溶解した後、同様に生細胞数を計数することにより測定した。培養液中のグルコース濃度は、グルコスタット法⁴⁾により測定した。また乳酸濃度は、乳酸脱水素酵素による乳酸の変換反応の際に生じる NADH (nicotinamide adenine dinucleotide, reduced form) を比色定量する酵素法により測定した。

2. 3 結果と考察

2. 3. 1 固定化していない細胞の酸素消費速度

固定化していない 4H11 を Fig. 2.2a に示す容器内に入れ DO の経時変化を測定すると、Fig. 2.3a に例を示すように、DO のごく低濃度領域を除いて DO は時間の経過とともに直線的に減少した。DO の高低にかかわらず DO が直線的

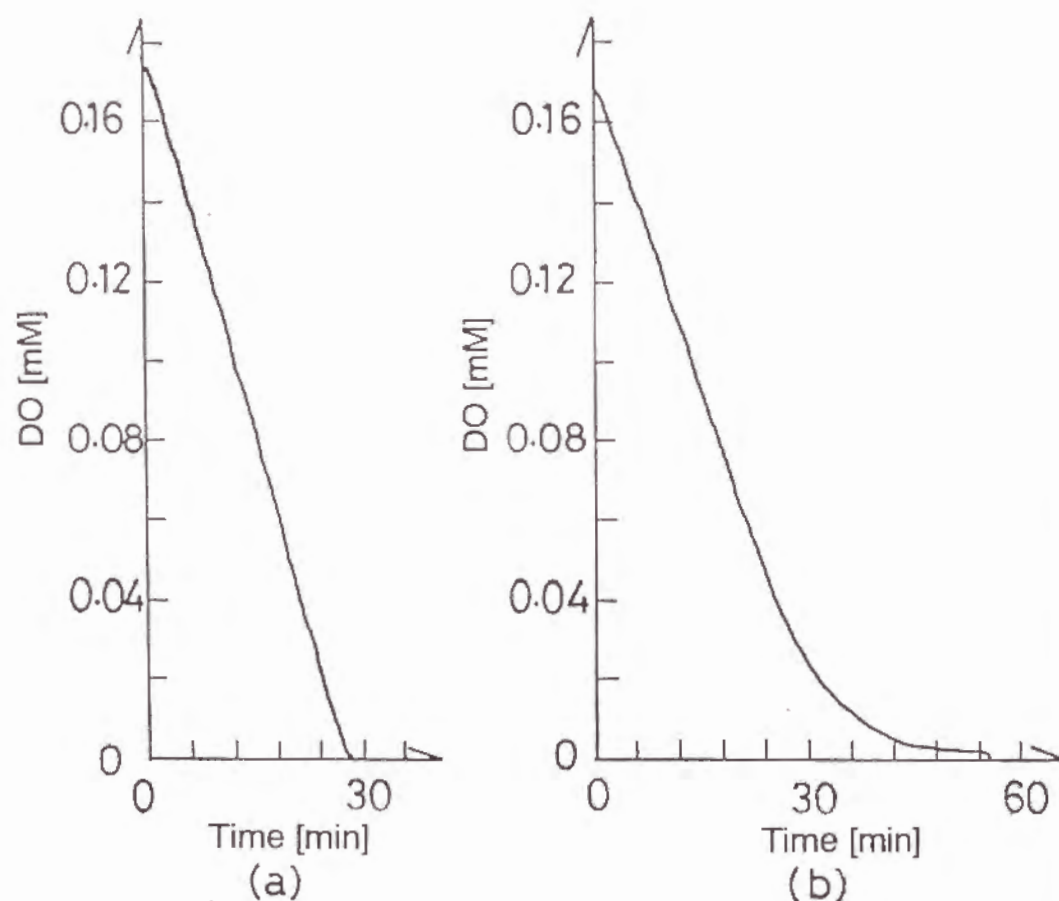


Fig. 2.3a, b. Examples of dissolved oxygen concentration (DO) changes in the measurement vessels. (a) Non-immobilized 4H11 hybridoma cells. (b) Immobilized 4H11 cells

に減少するという事は、細胞の酸素消費が0次反応であることを意味する。この直線の傾きと細胞密度から固定化していない細胞の比酸素消費速度を求めた。

固定化していない 4H11 の生育曲線を Fig. 2.4a に、4H11 の比酸素消費速度および培養液中のグルコース濃度と乳酸濃度の経時変化を Fig. 2.4b に示す。図にみられるように、4H11 の比酸素消費速度は、細胞の増殖期によらずほぼ一定の値 ($3.44 \times 10^{-13} \text{ mol/(h}\cdot\text{cell)}$) を示した。

同様の実験を行ない固定化していない 4C10B6 の比酸素消費速度を測定すると、固定化していない 4C10B6 の比酸素消費速度は $2.31 \times 10^{-13} \text{ mol/(h}\cdot\text{cell)}$ であった。

2. 3. 2 固定化細胞の酸素消費速度

4H11 を固定化したゲル粒子を Fig. 2.2b に示す容器内に入れ DO の経時変化を測定すると、Fig. 2.3b にみられるように、固定化していない細胞と同様に、DO の低濃度領域を除いて DO は時間の経過とともに直線的に減少した。この直線部分の傾きから固定化細胞の比酸素消費速度を求めた。

4H11 と 4C10B6 の両細胞について、アルギン酸カルシウムゲル粒子に固定化した細胞をペトリディッシュ内で静置培養し、固定化細胞の比酸素消費速度を測定した結果を Fig. 2.5 に示す。固定化していない細胞の比酸素消費速度は細胞の増殖期によらずほぼ一定であったため、Fig. 2.5 において、固定化細胞の比酸素消費速度は、固定化していない細胞のそれとの比 (固定化細胞の比酸素消費速度 / 固定化していない細胞の比酸素消費速度) で表示している。また、4H11 については、固定化細胞密度の経時変化も同じ図に示す。4C10B6 の固定化細胞密度については図中にその値を記入している。

図に示すように、細胞の比酸素消費速度の比は、培養開始時においてはほぼ

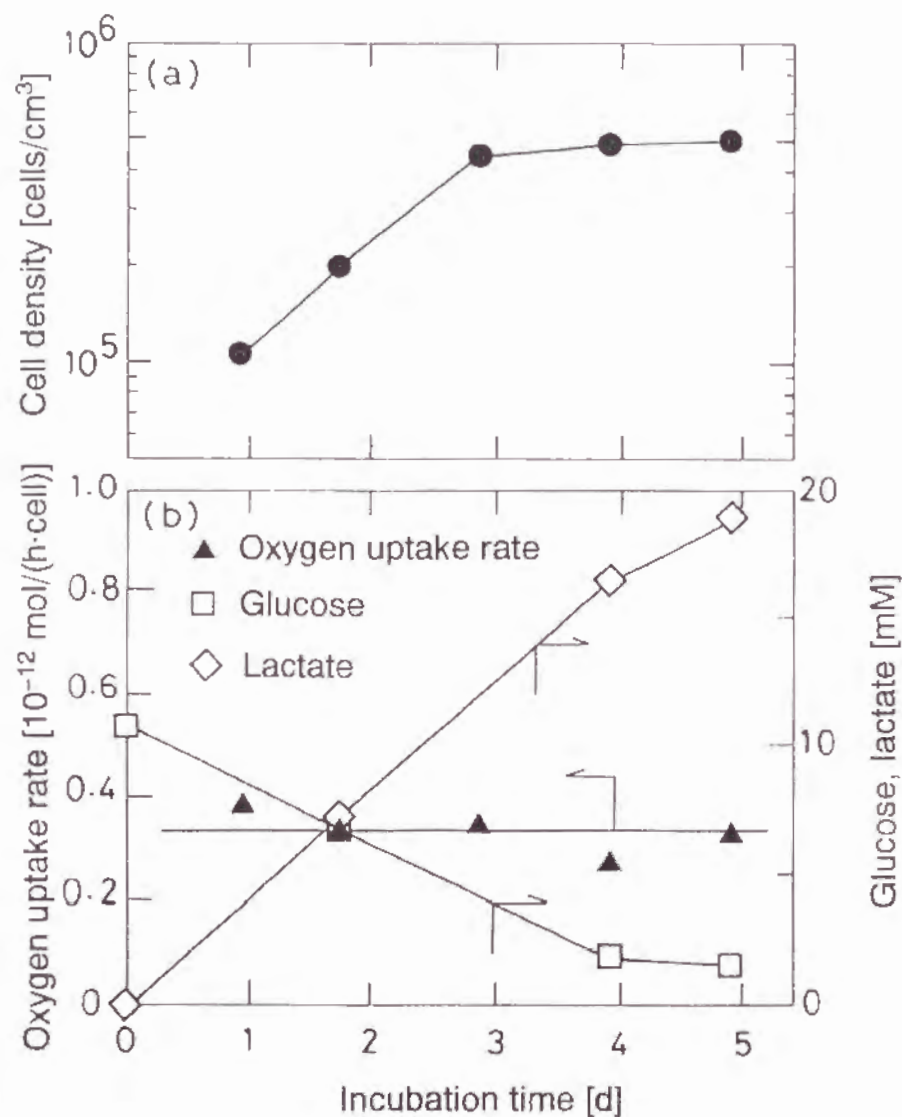


Fig. 2.4a, b. Oxygen uptake rate, glucose consumption and lactate accumulation during the growth of non-immobilized 4H11 cells. (a) Growth curve for 4H11 cells. (b) Oxygen uptake rates of 4H11 cells, and changes in concentration of glucose and lactate

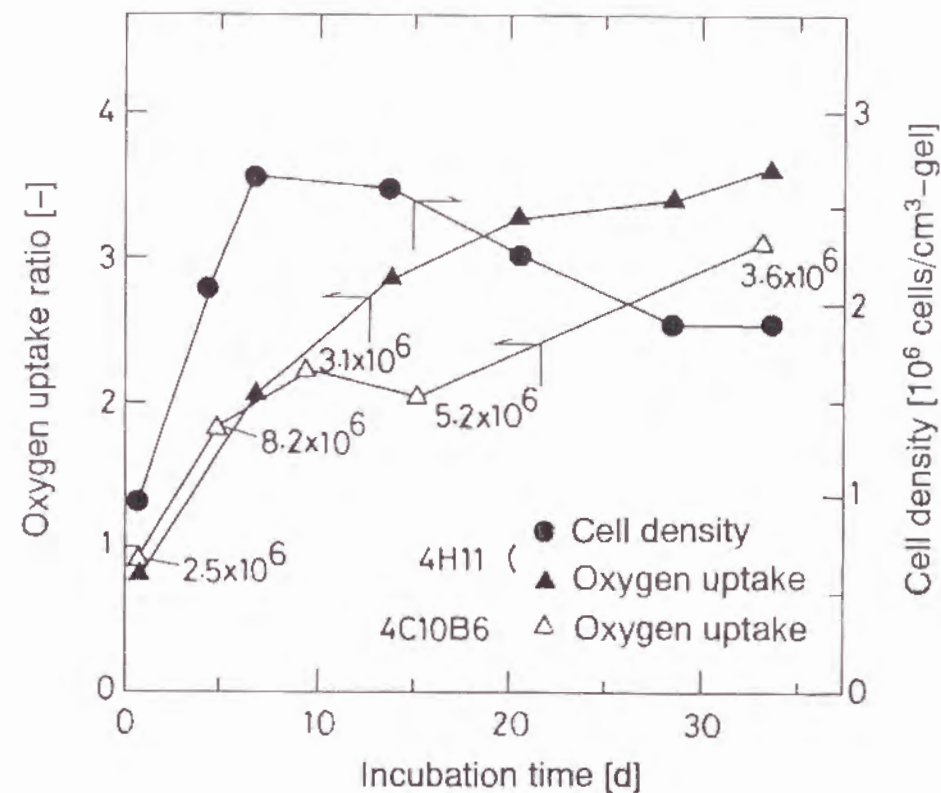


Fig. 2.5. Oxygen uptake rate of immobilized 4H11 and 4C10B6 cells. Numbers attached to *open triangles* represent cell concentrations at the time of immobilized 4C10B6 oxygen uptake measurement

1であり、固定化細胞の比酸素消費速度は、固定化直後においては固定化していない細胞の比酸素消費速度とほぼ同じであることがわかる。ところが、固定化細胞の比酸素消費速度は、培養時間の経過とともに増加し、培養終了時には固定化していない細胞の比酸素消費速度の3-3.6倍になった。また、4H11と4C10B6のどちらの細胞についても、固定化細胞の比酸素消費速度は、培養初期

においては固定化細胞密度の上昇とともに増加しているが、固定化細胞密度が減少しても比酸素消費速度の増加は続いている。よって、固定化細胞の比酸素消費速度の増加は、固定化細胞密度の高低には依存せず固定化細胞密度とは無関係であるように見える(固定化細胞の比酸素消費速度と固定化細胞密度との関係については、次節(2.3.3)で考察する)。

Gosmann と Rehm²⁾ は、アルギン酸カルシウムゲルに固定化した微生物の比酸素消費速度が固定化菌体濃度の増加につれて減少することを報告している。また、寒天ゲルに固定化した酵母やペレットを形成した糸状菌の酸素消費速度も、ゲル粒子やペレットの粒径が大きくなるにつれて減少することが報告されている^{5,6)}。一方、Frame と Hu⁷⁾ は、マイクロキャリアに付着した動物細胞の酸素消費速度がグルコース濃度によって影響を受け、培地中のグルコースが枯渇すると細胞の酸素消費速度が上昇することを報告している。よって、動物細胞と微生物とでは、固定化などにもない培養環境が変わった際の酸素消費速度の変化のしかたが異なることがわかる。動物細胞と微生物では呼吸に関する代謝調節の方法が異なっている可能性もあり得るものと考えられる。

2.3.3 固定化細胞の比酸素消費速度の増加とゲル粒子内における細胞のコロニーの形成との関係

Fig. 2.1 に示す培養槽を用いてアルギン酸カルシウムゲル粒子に固定化した 4H11 の培養を行ない、培養終了後にゲル粒子を取り出し酸素消費速度の測定を行なった。この培養では、(1) 固定化の際、細胞を低密度でゲル粒子に固定化し、(2) 培養中は培地中のグルコース濃度や DO を十分高く維持し、また (3) 固定化細胞密度があまり高くないうちに培養を終了することにより、酸素消費速度の測定時においても固定化細胞の生存率が低下しないようにした。

ゲル粒子内の細胞密度と固定化細胞の比酸素消費速度の関係を Fig. 2.6 に示

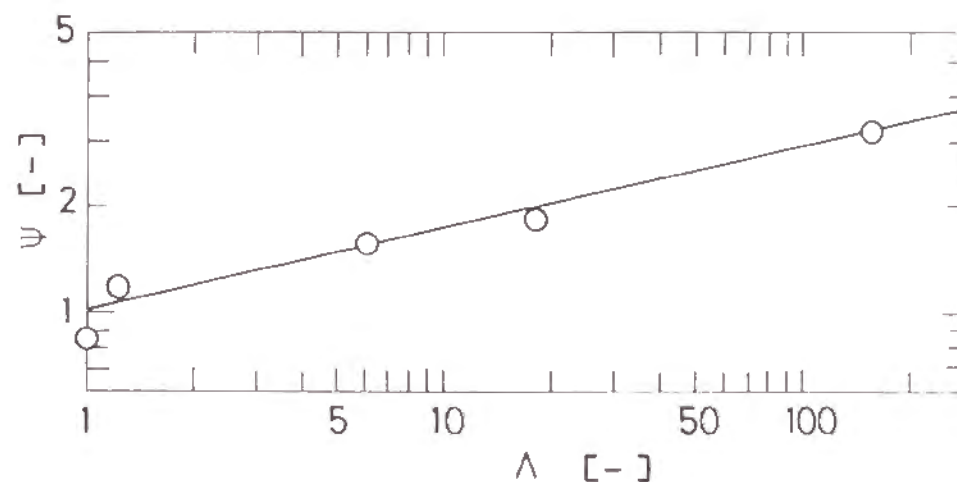


Fig. 2.6. Effect of number of 4H11 cells composing a colony in a gel particle on the specific oxygen uptake rate.

$$\Lambda = X/X_0, \quad \Psi = r_{O_2}/r_{O_2N}$$

X, cell concentration in a gel particle at the time of the measurement; X_0 , cell concentration at the beginning of the experiment; r_{O_2} , specific oxygen uptake rate of an immobilized cell; r_{O_2N} , specific oxygen uptake rate of a non-immobilized cell

す。図中、 Λ は無次元細胞密度 (ゲル粒子内の細胞密度/培養開始時におけるゲル粒子内の細胞密度)、 Ψ は無次元酸素消費速度 (固定化細胞の比酸素消費速度/固定化していない細胞の比酸素消費速度) を意味する。培養中、培地中のグルコース濃度や DO を十分高く維持しているため、ゲル粒子内における細胞の増殖速度は一定であると考えられ、また固定化細胞の生存率は低下していないため、 Λ はゲル粒子内で形成されたコロニーを構成する細胞数に相当する。図のように、 Λ と Ψ との関係は両対数グラフ上で直線となり、固定化細胞の比酸素消費速度は、ゲル粒子内における固定化細胞密度、すなわちゲル粒子内で形成

されたコロニーを構成する細胞数と正の相関関係にあることがわかる。

Fig. 2.5 に比酸素消費速度 (図中 ● のキーで示す) と細胞密度 (▲ で示す) の経時変化を示した 4H11 の培養では、固定化細胞の比酸素消費速度と固定化細胞密度とは一見無関係であり、Fig. 2.6 に示される両者の関係と矛盾するように見える。この理由は次のように考えられる。Fig. 2.6 に結果を示した培養は培養環境を良好に維持し、細胞の生存率が低下しないように培養を行なった。これに対し、Fig. 2.5 に結果を示した 4H11 の培養はペトリディッシュにおける静置培養であり、培養環境を制御できないものである。培養時間の経過につれてゲル粒子の表面近傍では細胞の増殖が活発に起こるが、これにともないゲル粒子の中心付近では酸素や栄養分が不足するため細胞は死滅していくものと思われる。そうすると、ゲル粒子内に細胞密度の高低の分布が生じていることになるが、固定化細胞密度はこれを平均した値である。固定化細胞密度の平均値が増加していなくとも、ゲル粒子の表面近傍の局所的な細胞密度は培養時間の経過にともない増加しているものと思われ、この局所的な細胞密度を用いると、Fig. 2.6 にみられるような固定化細胞の比酸素消費速度と固定化細胞密度との正の相関関係が得られるものと考えられる。

次に、種々の初期細胞密度で 4H11 をアルギン酸ゲル粒子に固定化し、1 日間ペトリディッシュ内で静置培養した後の固定化細胞の比酸素消費速度を測定した。その結果を Table 2.1 に示す。表にみられるように、固定化細胞の比酸素消費速度は、最大 4.52×10^{-13} mol/(h·cell) となったが、初期細胞密度を 2.3×10^7 cells/cm³-gel まで高くしても、固定化していない細胞の比酸素消費速度 (3.44×10^{-13} mol/(h·cell)) とほとんど変わらなかった。したがって、固定化直後の細胞がゲル粒子内で個々に分散している状態では、固定化細胞密度を高くしても固定化細胞の比酸素消費速度は増加しないことがわかる。

また、ゲル粒子内でコロニーを形成した固定化細胞を、ゲルを溶解すること

Table 2.1. Oxygen uptake rate of immobilized 4H11 cells and cell concentration in the gel particles

Cell concentration [cells/cm ³ -gel]	Oxygen uptake rate [mol/(h·cell)]
8.8×10^5	2.67×10^{-13}
1.0×10^6	2.91×10^{-13}
1.7×10^6	4.09×10^{-13}
5.8×10^6	4.52×10^{-13}
1.1×10^7	3.60×10^{-13}
2.3×10^7	2.14×10^{-13}
	Av. 3.32×10^{-13}
Non-immobilized	3.44×10^{-13}

により培地中に分散懸濁した状態に戻して、比酸素消費速度を測定し、その変化を調べた。すなわち、ゲル粒子に固定化した 4C10B6 をペトリディッシュ内で静置培養し、(1) 培養 16 日目および 33 日目にまず固定化細胞の比酸素消費速度を測定した。その後、(2) ゲル粒子を溶解することにより細胞を培地中に分散懸濁した状態に戻して比酸素消費速度を測定した。培養 16 日目の細胞については、(3) 固定化していない状態のままさらに 2 日間静置培養を行ない、もう一度比酸素消費速度を測定した。比酸素消費速度の測定結果を Table 2.2 に示す。培養 16 日目および 33 日目において、固定化細胞はゲル粒子内でコロニーを形成しているのが顕微鏡下において観察され、固定化細胞の比酸素消費速度は固定化していない細胞に比べて 1.7-3.1 倍高くなっているが、ゲルを溶解し細胞をコロニーから分散させると、比酸素消費速度は約 1/2 にまで低下し、固定化していない細胞の比酸素消費速度 (2.31×10^{-13} mol/(h·cell)) とほぼ同等の値にまで戻ることがわかる。

Table 2.2. Change in oxygen uptake rate between the 4C10B6 cells immobilized and non-immobilized after dissolution of the immobilized gel particles

Cultivation time [d]	Oxygen uptake rate [mol/(h·cell)]		
	Immobilized cell	Just after dissolution	2 days after dissolution
16	3.89×10^{-13}	2.08×10^{-13}	2.47×10^{-13}
33	7.20×10^{-13}	3.53×10^{-13}	—

以上に述べたように、Fig. 2.6, Table 2.1 および Table 2.2 に示した結果は、固定化細胞の比酸素消費速度の増加が、ゲル粒子内における細胞のコロニーの形成やコロニーを構成する細胞数の増加と密接に関係していることを示唆している。細胞がゲル粒子内に固定化されてコロニーを形成することにより細胞どうしが近接して生育していることが、比酸素消費速度の増加を引き起こす原因になっているものと考えられる。

2. 3. 4 固定化細胞のグルコース消費と乳酸生産

1 分子のグルコースが細胞内で解糖系により嫌氣的に代謝されると、次の量論式に示すように、2 分子の乳酸が生成するとともに 2 分子の ADP (adenosine diphosphate) から 2 分子の ATP (adenosine triphosphate) が得られる。



一方、1 分子のグルコースが TCA サイクル (tricarboxylic acid cycle) を経て完

全に酸化されると、次式に示すように 36 分子の ATP が得られる。



ゲル粒子に固定化した 4H11 の静置培養を行ない、固定化細胞密度と培地中のグルコース濃度、乳酸濃度を測定し、固定化細胞の比グルコース消費速度およびグルコースから乳酸への選択率を求めた。Fig. 2.7 に、固定化細胞密度、比グルコース消費速度、および乳酸への選択率の経時変化を示す。式 (1) および (2) から明らかなように、グルコースから乳酸への選択率が 1 になるとグルコースはすべて嫌氣的に代謝され、乳酸への選択率が小さくなるほどグルコースは好氣的に代謝される割合が大きくなることを意味する。図に示すように、固定化細胞の比グルコース消費速度は、固定化細胞の指数増殖期以降若干低下した。また、乳酸への選択率も固定化細胞の指数増殖後低下しており、グルコースが好氣的に代謝される割合が増加していることがわかる。

式 (1), (2) に基づいてグルコースと酸素の消費量から乳酸の生産量を計算することができる。Fig. 2.7 に示した固定化細胞の比グルコース消費速度と Fig. 2.5 に示した比酸素消費速度から計算したグルコースから乳酸への選択率を Fig. 2.7 に □ のキーでプロットした。図にみられるように、乳酸への選択率の計算結果は測定値の経時変化とよく一致しており、これは、固定化細胞の比酸素消費速度の増加現象が、固定化細胞のグルコース消費と乳酸生成の量論関係からみても妥当であることを示している。

上に述べたように、細胞をアルギン酸カルシウムゲル粒子に固定化して培養するとグルコースが好氣的に代謝される割合が増加したが、式 (1), (2) よりこれは単位グルコースあたりの ATP 収率が増加したことを意味する。最近、Lee らは、(1) ある種のハイブリドーマを無血清培地を用いて浮遊懸濁状態で培養す

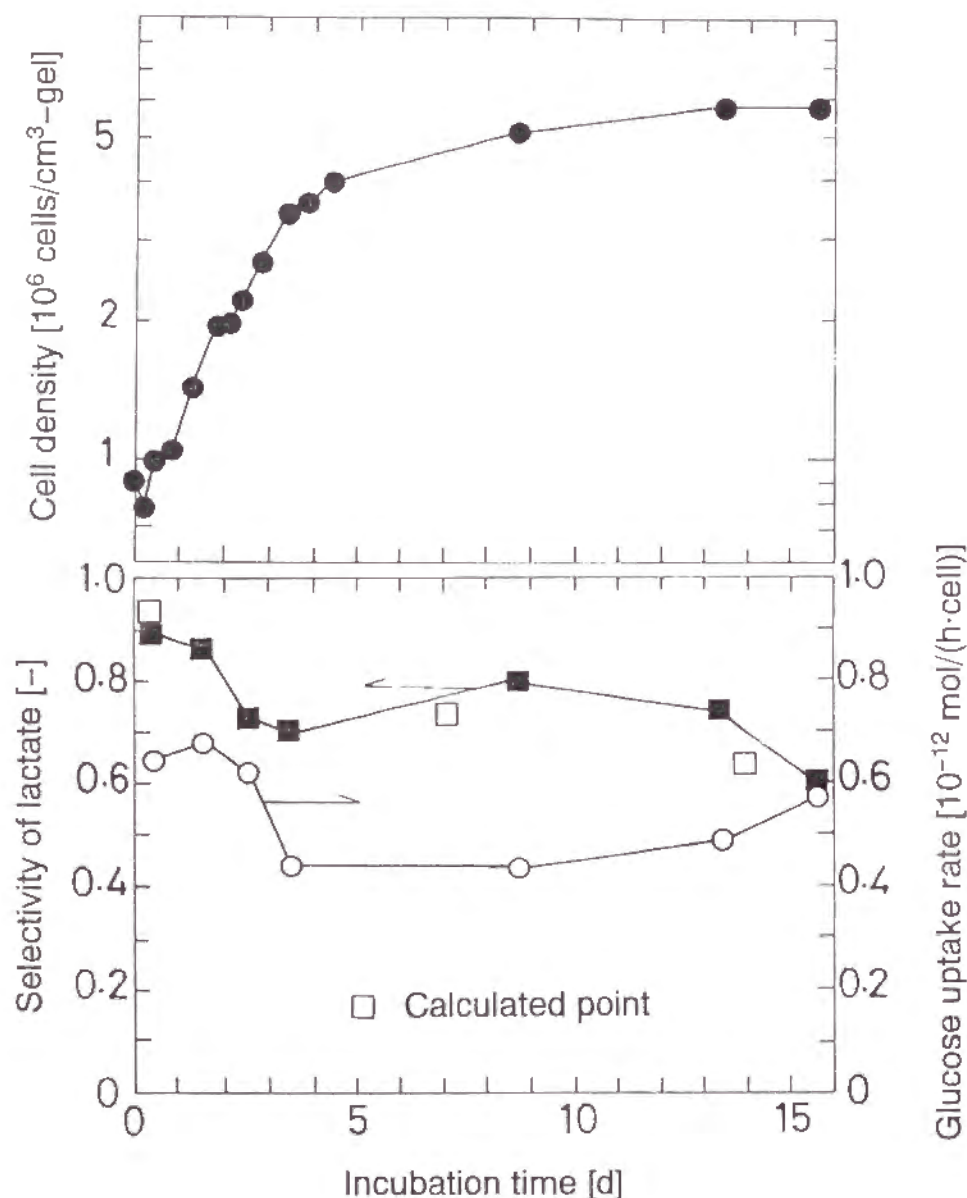


Fig. 2.7. Changes of selectivity of lactate and glucose consumption rate by the immobilized 4H11 cells. The upper graph indicates a change of the cell concentration in the gel particles during the same period

ると、血清培地を使用した場合に比べて、細胞のモノクローナル抗体の生産性が低下するのに対し、アルギン酸カルシウムゲルに固定化して培養を行なうと、無血清培地を用いた場合でも細胞のモノクローナル抗体の生産性が安定に維持されることや、(2) アルギン酸カルシウムゲルに固定化して培養を行なうと、固定化せずに培養した場合に比べて細胞1個あたりのモノクローナル抗体の生産性が3倍以上高くなったことを報告している^{8,9)}。彼らは酸素消費速度の測定は行っていないが、固定化により ATP 収率が増加することが、モノクローナル抗体の生産の安定化や生産性の増強を引き起こしている可能性が考えられる。一方、第1章で述べたように、4H11 をアルギン酸カルシウムゲルに固定化して培養しても、細胞の増殖速度やモノクローナル抗体の生産性に変化はみられなかった。今後、増加した ATP が固定化 4H11 の細胞内でどのように利用されているかを解明し、細胞の物質生産性や機能の増強に結び付けることが望まれる。

以上に述べてきたように、ハイブリドーマをアルギン酸カルシウムゲル粒子に包括固定化して培養すると、ゲル粒子内において固定化細胞がコロニーを形成することにともない固定化細胞の比酸素消費速度が増加するという特性がみられた。このような現象は、細胞を固定化しない培養からは予想できない、固定化増殖細胞に特徴的なものである。固定化細胞の比酸素消費速度の増加、すなわち ATP 収率の増加が、細胞の増殖速度やモノクローナル抗体の生産性の増強に結び付くといった結果は得られていないものの、このような固定化にともなう培養特性の変化を把握しておくことは、合理的なバイオリアクターの設計や最適な操作を行なうために重要であると思われる。

2. 4 結論

アルギン酸カルシウムゲル粒子に包括固定化したハイブリドーマの比酸素消費速度を測定し、固定化していない細胞との比較を行なった。固定化細胞の比

酸素消費速度は、固定化直後においては固定化していない細胞のそれと同等であったが、培養の経過とともに増加した。一方、固定化細胞の比グルコース消費速度は若干減少した。この固定化細胞の比酸素消費速度の増加は、ゲル粒子内における細胞のコロニーの形成と密接に関係していることを明らかにした。

参考文献

- 1) 橋本健治, 白井義人, 固定化細胞 (田中渥夫編著), 講談社サイエンティフィック, pp 1-80 (1992)
- 2) Gosmann, B. and H.J. Rehm, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **23**, 163-167 (1986)
- 3) Sawada, S., M. Suzuki, T. Kawamura, S. Fujinaga, Y. Masuho and K. Tomibe, *J. Infect. Dis.*, **150**, 570-576 (1984)
- 4) Toren Jr. E.C., *J. Chem. Educ.*, **44**, 172-174 (1967)
- 5) Kobayashi, T., G. Van Dedem and M. Moo-Young, *Biotechnol. Bioeng.*, **15**, 27-45 (1973)
- 6) Sato, K. and K. Toda, *J. Ferment. Technol.*, **61**, 239-245 (1983)
- 7) Frame, K.K. and W.S. Hu, *Biotechnol. Lett.*, **7**, 147-152 (1985)
- 8) Lee, G.M. and B.O. Palsson, *Biotechnol. Bioeng.*, **36**, 1049-1055 (1990)
- 9) Lee, G.M., A. Varma and B.O. Palsson, *Biotechnol. Bioeng.*, **38**, 821-830 (1991)

第Ⅱ編 多孔性の細胞保持粒子を用いるミエローマの固定化と培養特性

第3章 ポリビニルホルマール樹脂多孔質体を細胞保持粒子として用いる浮遊性動物細胞の固定化

3.1 緒言

第1編で検討したアルギン酸カルシウムゲル包括法は、人為的に細胞を固定化するいわゆる "active" な固定化法である。アルギン酸ゲルへの包括固定化は、ゲル包括法の中では固定化の操作が最も簡単であるが、工業的規模で応用するには固定化のための特別なプロセスを必要とする。

このような active な固定化法に対し、Atkinson ら^{1,2)} は、球状に加工したステンレススチールワイヤーや立体網状構造を有する高分子素材の発泡体 (緒論, Fig. 0.1 参照) に、フィルムやブロックを形成する微生物を "passive" に固定化する方法を開発し、これらの多孔性の担体粒子を Biomass Support Particles (BSPs と略す)、すなわち細胞保持粒子と名付けた。細胞保持粒子を用いる固定化法は、微生物などの細胞がもつ固体表面への付着力あるいは結合力を利用し、その増殖過程において細胞が多孔性の粒子内に自然に固定化されるものであり、これまでに糸状菌、放線菌、酵母、バクテリアなどの種々の微生物から植物細胞まで幅広く応用されている (緒論, Table 0.3 参照)。本固定化法は、active な固定化法と比べて、(1) 固定化の操作が簡単である、(2) 固定化担体粒子が強固である、(3) 固定化担体が再使用可能である、などの特徴を有しているため、工業的規模での利用を考えると有利な固定化法であると思われる。

多孔性の担体粒子を用いる浮遊性動物細胞の固定化に関して、上のような流れとは別に、最近、アメリカの Verax 社ではコラーゲンからなるスポンジ状の担体粒子にハイブリドーマなどを固定化して培養するシステムを開発した³⁾。コ

ラーゲンは、動物の生体内の組織や細胞間で細胞の足場となるタンパク質である。Verax社のシステムは、細胞とコラーゲンとの親和性を利用することにより浮遊性細胞を多孔性の担体粒子内に固定化するもので、担体粒子内で 10^8 cells/cm³ 程度の高密度培養が達成可能なことが報告されている。しかし、このシステムは、固定化担体粒子がきわめて高価であるうえに担体粒子の再利用が困難であるという欠点を有する。

合成高分子などの安価な素材でできた多孔質体を細胞保持粒子として用いることにより浮遊性動物細胞を固定化することができれば、工業的規模でも応用可能な低コストでシンプルな培養プロセスが構築できるものと期待される。そこで本章では、比較的孔径が小さいポリビニルホルマール (polyvinyl formal, PVF) 樹脂多孔質体を細胞保持粒子として使用する浮遊性動物細胞の固定化の可能性を、静置培養および振とう培養において検討した。

3. 2 実験

3. 2. 1 細胞と培地

浮遊性動物細胞のモデル細胞として、マウスミエローマ MPC-11 (ATCC CCL 167) を使用した。MPC-11 は IgG2b クラスのイムノグロブリン産生株である⁴⁾。

培地は、基本合成培地として RPMI 1640 培地、ダルベッコ変法イーグル培地 (DME)、ハム F12 培地 (いずれも、日水製薬) を 2:1:1 の比で混合した RDF 培地⁵⁾ (RPMI 1640, 5.46 g/l ; DME, 2.62 g/l ; F12, 2.78g/l) に、NaHCO₃ を 1.05 g/l, HEPES (*N*-(2-hydroxyethyl)piperazine-*N'*-(2-ethane sulphonic acid)) (同仁化学研究所) を 0.36 g/l, ペニシリンGカリウム (明治製菓) を 10⁵ units/l, 硫酸ストレプトマイシン (明治製菓) を 0.1 g unit/l, 牛胎児血清 (Flow Laboratories) を 100 ml/l 添加した血清培地を使用した。ただし、振とう培養実験では HEPES を 5.96 g/l 添加したものをを用いた。

3. 2. 2 細胞保持粒子

通常、フィルター材料として用いられる平均孔径 30, 60, および, 100 μ m の PVF 樹脂スポンジシート (カネボウ化成 ; ペルイーター, A-3000) を 3×3×3 mm の大きさに切ったもの (Fig. 3.1) を、細胞保持粒子として使用した。

PVF 樹脂は、親水性のポリビニルアルコールにホルムアルデヒドをホルマール化反応により結合させたものである。本研究で使用した PVF 樹脂多孔質体は、デンプンなどの細孔生成剤を含浸させた状態でホルマール化反応を行ない、不溶性の多孔質構造が完成した後細孔生成剤を抽出することにより、多孔質体としたものである⁶⁾。したがって、PVF 樹脂多孔質体は、

- (1) 連続細孔構造を有する、
- (2) 平均孔径が 8 μ m から 1 mm とごく微小なものから比較的大きなものまで様々な孔径をもった多孔質体を選択できる、



Fig. 3.1. Reticulated polyvinyl formal (PVF) resin biomass support particles (3×3×3 mm cubes; mean pore size, 60 μ m)

- (3) 90% 近くの空隙率をもつ (Table 3.1 参照, みかけ密度は $0.12-0.15 \text{ g/cm}^3$),
 - (4) 親水性である,
 - (5) 機械的強度が大きい,
 - (6) オートクレーブにより滅菌可能である,
- などの特徴をもつ。

保持粒子は、蒸留水およびオートクレーブ可能な RPMI 1640 培地 (白水製薬) で洗浄後、 121°C で 20 min オートクレーブすることにより滅菌した。

3. 2. 3 固定化細胞の静置培養

滅菌した 3 種類の保持粒子をそれぞれ 40 個ずつロート上に置き、まず保持粒子を新鮮培地で洗浄した。次に、保持粒子上に指数増殖期にある細胞懸濁培地 (生細胞密度: $7.3 \times 10^5 \text{ cells/cm}^3$) 10 ml をピペットを用いて滴下した。保持粒子を通過した細胞懸濁培地をさらに 2 度粒子上に滴下することにより、細胞を保持粒子に捕捉させた。その後、各保持粒子を 36 個ずつ底面積が 25 cm^2 の培養フラスコ (岩城硝子) に移し、10 ml の新鮮培地を加え、 CO_2 インキュベーター (5% CO_2 , 37°C) 内で静置培養を行なった。培地は毎日 10 ml 全量を新鮮培地と交換した。細胞のグルコース消費速度と IgG 生産速度を把握するために、培養中適宜、前回の培地交換後 24 h 経過した培養液をサンプリングし、グルコースと IgG の濃度を測定した。

3. 2. 4 固定化細胞の振とう培養

外径 40 mm、長さ 130 mm の平底試験管 (岩城硝子) 3 本に、それぞれオートクレーブ可能な RPMI 1640 培地と 3 種類の細胞保持粒子を 40 個ずつ入れオートクレーブにより滅菌を行なった。保持粒子を新鮮培地で洗浄した後、指数増殖期にある細胞懸濁培地 (生細胞密度: $3.2 \times 10^5 \text{ cells/cm}^3$) を 10 ml ずつ各

試験管に加え、往復振とう恒温槽にて大気中で 2 日間振とうすることにより (振とう速度, 100 min^{-1} ; 振幅, 3 cm; 培養温度, 37°C)、細胞を保持粒子に播種した。その後、細胞懸濁培地を除去し、毎日培地を 10 ml 全量新鮮培地と交換しながら、振とう培養を継続した (振とう速度, 75 または 100 min^{-1} ; 振幅, 3 cm; 培養温度, 37°C)。

3. 2. 5 走査電子顕微鏡 (SEM) による固定化細胞の観察

細胞を固定化した保持粒子をダルベッコのリン酸緩衝食塩水 (PBS; NaCl, 8 g/l; KCl, 0.2 g/l; Na_2HPO_4 , 1.15 g/l; KH_2PO_4 , 0.2 g/l) (白水製薬) で十分に洗浄した後、2% ホルムアルデヒドと 4% グルタルアルデヒドの混合液に 2 h 浸漬し、前固定を行なった。PBS で洗浄後、保持粒子を 1% オスミウム酸固定液に 1 h 浸漬し、後固定した。PBS で十分洗浄した粒子を、エタノール系列 (50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, および 100% エタノール) に順次浸漬することで脱水し、最後に 100% 酢酸イソアミルに移した。脱水後、臨界点乾燥装置 (日立工機) を用いて保持粒子を乾燥した。乾燥した保持粒子を液体窒素に浸漬し、液体窒素から取り出した直後に粒子を切断した。切断した粒子の断面に金・パラジウムを蒸着し、SEM (日立製作所; S-800) にて観察を行なった。

3. 2. 6 分析方法

固定化していない細胞の生細胞密度は、細胞懸濁培地に 0.2% トリパンブルー溶液を 9:1 の比で加えた後、未染色細胞を顕微鏡下 Burker Turk 型血球計算板にて計数することにより測定した。培養液中のグルコース濃度は、グルコースアナライザー (Beckman Instruments) を用いて測定した。また、IgG 濃度は ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) 法により測定した。

3. 3 結果と考察

3. 3. 1 静置培養による固定化の可能性の検討

これまで微生物や植物細胞を固定化する保持粒子として用いられてきた担体は、球状に加工したステンレススチールワイヤーや立体網状構造を有するポリウレタンフォーム (緒論, Fig. 0.1 参照) などの発泡体であり, 比較的細孔構造の大きいものである。浮遊性動物細胞の場合, 微生物のような固体表面への強固な付着力や結合力, また植物細胞のように大きな凝集塊を形成することは期待できない。そこで, 比較的孔径の小さいものが得られる PVF 樹脂多孔質体を細胞保持粒子として用いることを中心に, 浮遊性動物細胞の細胞保持粒子への固定化の可能性を検討した。

まず, 大きさ $3 \times 3 \times 3$ mm, 平均孔径が 30, 60, および 100 μm の 3 種類の PVF 樹脂多孔質体の細胞保持粒子上に MPC-11 を懸濁した培地を滴下することにより, PVF 樹脂多孔質体の細胞保持能を検討した。滴下前の細胞懸濁培地の細胞密度と保持粒子を通過した培地の細胞密度との差から, 保持粒子に捕捉された初期細胞密度を計算した結果を **Table 3.1** に示す。表にみられるように, 細胞懸濁培地中の 18-36% の細胞が保持粒子に捕捉され, 平均孔径 30, 60, および 100 μm の PVF 樹脂多孔質体の細胞保持粒子内に, それぞれ 1×10^6 cells/cm³-BSP 以上の密度で細胞を保持させることができた。このような播種操作により浮遊性動物細胞が PVF 樹脂多孔質体の細胞保持粒子内に保持されるのは, 細胞が PVF 樹脂多孔質体 (本来, フィルター材料として使用されている) の 3 次元的に連続した多孔質構造の微細なネットワークに物理的に捕捉されるためと考えられるが, 浮遊性細胞とはいえ弱いながらも細胞のもつ PVF 樹脂表面への付着力も寄与しているものと思われる。しかしながら, 同じ PVF 樹脂多孔質体でも平均孔径 250 μm と比較的孔径の大きいものや, さらに孔径の大きいポリウレタンフォームには, 同様の操作を行っても細胞をほとんど保持させる

Table 3.1. Comparison of reticulated polyvinyl formal (PVF) resin biomass support particles (BSPs) as a support for entrapment of mouse myeloma MPC-11 cells

Reticulated PVF resin BSPs				Ratio of entrapped cells ^b [-]	Initial immobilized cell density ^b [10 ⁶ cells/cm ³ -BSP]
Type	Number	Mean pore size ^a [μm]	Porosity ^a [-]		
1	A-3160	30	0.91	0.225	1.63
2	A-3210	60	0.88	0.358	2.47
3	A-3310	100	0.84	0.178	1.19

^a Manufacturer's data

^b These values were calculated on the mass balance of cells before and after the immobilization operation described in the experimental procedure. The viable cell density in the medium used for immobilization was 7.26×10^5 cells/cm³

ことができないことを別の実験で確認した。よって, 浮遊性動物細胞を多孔性の細胞保持粒子に固定化するには, 平均孔径が 30-100 μm 程度の比較的細かいマトリックスが必要であることがわかる。

保持粒子に捕捉された細胞は, 毎日培地を全量交換しながら CO₂ インキュベーター内で静置培養を行なった。保持粒子内の細胞密度を直接測定することはできないので, ここでは細胞のグルコースの消費と IgG の生産を測定することにより間接的に細胞の増殖を追跡した。保持粒子に捕捉された細胞のグルコース消費速度および IgG 生産速度の経時変化を, それぞれ **Fig. 3.2a** および **3.2b** に示す。図にみられるように, 固定化細胞のグルコース消費速度および IgG 生産速度は, いずれも培養 1-2 週間後には細胞の播種直後における値の約 10 倍に達した。細胞の比グルコース消費速度および比 IgG 生産速度は固定化に

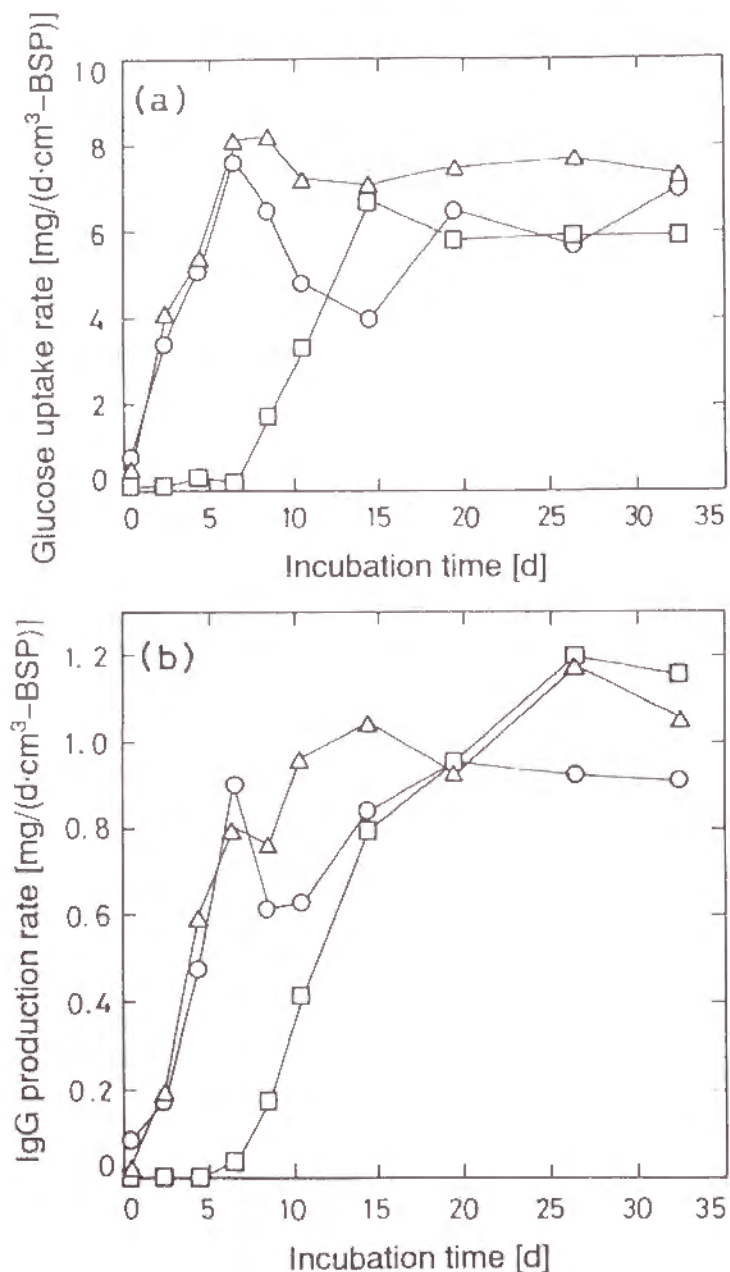


Fig. 3.2a, b. Growth of mouse myeloma MPC-11 cells entrapped in reticulated PVF resin BSPs in static culture. (a) Time course of glucose uptake rate. (b) Time course of IgG production rate. ○, BSP type 1; △, BSP type 2; □, BSP type 3. Mean pore size and porosity are listed in Table 3.1. Glucose uptake rate and IgG production rate were calculated by measuring glucose and IgG concentration in replaced medium

より大きく変化しないと思われるので(第1章, 1. 3. 1 および第2章, 2. 3. 4 参照), 初期細胞密度と固定化細胞のグルコース消費速度およびIgG生産速度の経時変化とから考えると, 細胞は保持粒子内で少なくとも 1×10^7 cells/cm³-BSP 以上の高密度に達しているものと推定される。

培養1-2週間後には, 固定化細胞のグルコース消費速度およびIgG生産速度の急激な増加は停止し, ほぼ定常に達した。培地交換の際除去した培養液中にはグルコースがまだ新鮮培地における含有量の半分程度残存していたことから, 溶存酸素の不足が保持粒子内におけるこれ以上の高細胞密度化を妨げているものと思われる。固定化細胞のグルコース消費速度およびIgG生産速度はその後約30日間高い値を維持し, 長期にわたる高密度培養が可能になったことがわかった。

3. 3. 2 SEMによる固定化細胞の観察

培養22日目の平均孔径60 μmおよび100 μmの保持粒子の内部をSEMで観察した結果を, Fig. 3.3に示す。写真にみられるように, 細胞はPVF樹脂多孔質体のマトリックス内で大きなコロニーを形成していることがわかる。したがって, 浮遊性動物細胞の保持粒子への固定化のメカニズムは微生物とは異なり, 最初に捕捉した細胞が核となって増殖し保持粒子のマトリックス内でコロニーを形成した結果, 粒子内の緩やかな培地の流動条件下ではマトリックスから逃れられなくなるにより固定化がなされるものと考えられる。

Fig. 3.2にみられるように, 平均孔径100 μmの保持粒子に捕捉された細胞のグルコース消費速度およびIgG生産速度は, 培養開始後7日間増加しなかった。このような細胞増殖の遅れは, 平均孔径130 μmの保持粒子に捕捉された細胞の培養においてもみられた。この理由は上に述べた固定化のメカニズムから次のように説明できる。平均孔径が100 μm以上の保持粒子は比較的マトリックスが大きいので, 培養開始後しばらくの期間は培地交換の際に細胞の漏出が著しい

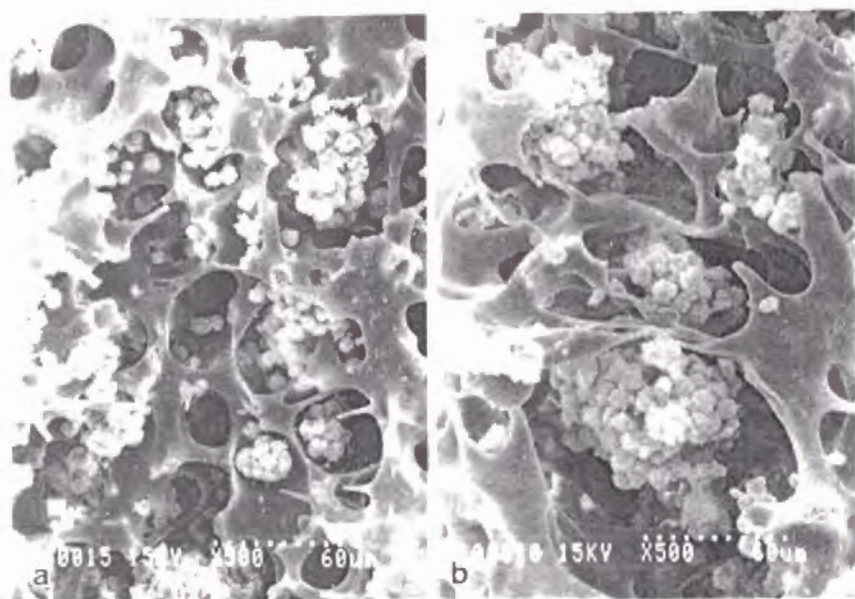


Fig. 3.3a, b. Scanning electron micrographs of MPC-11 cells immobilized in reticulated PVF resin BSPs. (a) BSP type 2 (500×). (b) BSP type 3 (500×)

ものと思われる。このため、細胞のグルコース消費速度および IgG 生産速度は増加しない。ところが、一部の細胞がマトリックス内でコロニーを形成することにより保持粒子内に固定化された細胞が増えはじめ、細胞のグルコース消費速度および IgG 生産速度が上昇したものと思われる。

3. 3. 3 固定化細胞の振とう培養

次に、培地の流動下における PVF 樹脂多孔質体の細胞保持粒子の細胞保持能を検討するために、振とう培養実験を行なった。まず、平底試験管内で3種類の細胞保持粒子を細胞懸濁培地をとともに2日間往復振とうすることにより、細胞を保持粒子に捕捉させた。2日間振とう後の細胞懸濁培地の細胞密度とコ

ントロールとして保持粒子なしで振とうした細胞懸濁培地の細胞密度との差から、保持粒子に捕捉された初期細胞密度を計算した。算出した初期細胞密度を Table 3.2 に示す。表にみられるように、細胞懸濁培地中の 42-77% の細胞が保持粒子に捕捉され、振とう法によっても、平均孔径 30, 60, および 100 μm の保持粒子内にそれぞれ 1×10^6 cells/cm³-BSP 以上の密度で細胞を保持させることができることがわかる。

保持粒子に捕捉された細胞は、毎日培地を全量交換しながら、振幅 3 cm、振とう速度は培養開始後6日間は 75 min⁻¹、それ以降は 100 min⁻¹ で振とう培養を継続した。保持粒子に捕捉された細胞のグルコース消費速度の経時変化を Fig. 3.4 に示す。平均孔径 60 および 100 μm の保持粒子に捕捉された細胞のグルコース消費速度は、振とう速度を 75 min⁻¹ から 100 min⁻¹ に上げると一旦減少したものの、培養8日目以降静置培養と同等以上のレベルに達した。したがって、振とう条件下でも静置培養同様、捕捉された細胞は保持粒子内で 1×10^7

Table 3.2. Entrapment of MPC-11 cells by incubating reticulated PVF resin BSPs in a shake flask

BSP type	Ratio of entrapped cells [-]	Initial immobilized cell density ^a [10 ⁶ cells/cm ³ -BSP]
1	0.420	1.91
2	0.745	3.38
3	0.771	3.50

^a These values were calculated on the mass balance of cells in the medium with and without BSPs after 2 days of shaking. The viable cell density in the medium before shaking was 3.19×10^5 cells/cm³, and that after shaking without BSPs as control reached 4.63×10^5 cells/cm³

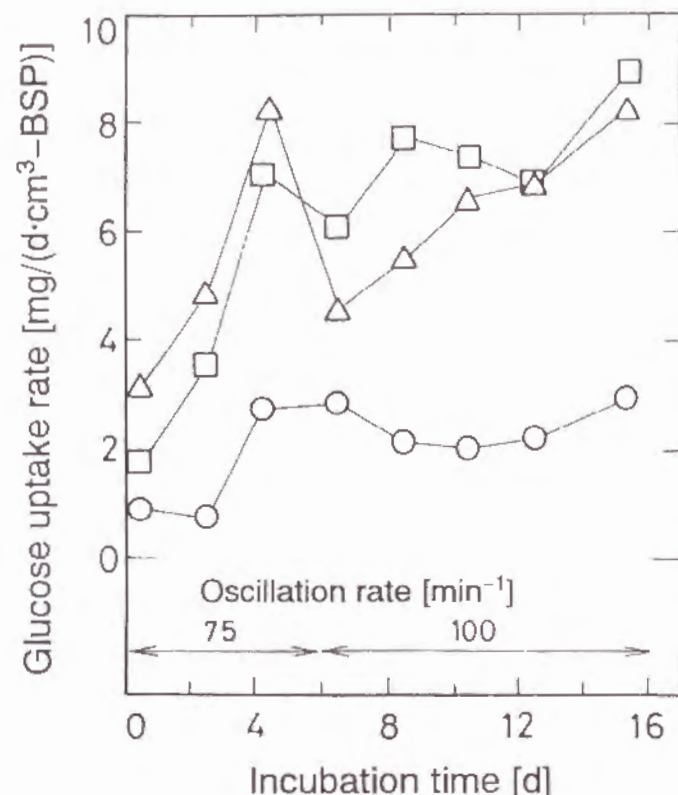


Fig. 3.4. Growth of MPC-11 cells entrapped in reticulated PVF resin BSPs in shake-flask cultivation following an inoculation period of 2 days: ○, BSP type 1; △, BSP type 2; □, BSP type 3

cells/cm³-BSP 以上の高密度に達しているものと思われる。また、培養 10 日目において、平均孔径 60 および 100 μm の保持粒子から培地中に漏出した生細胞の密度は 1×10⁴ cells/cm³ 以下であった。よって、細胞は保持粒子にしっかりと固定化されており、ここで設定した振とう条件下では細胞の漏出は問題にならないことがわかる。

一方、平均孔径 30 μm の保持粒子に固定化された細胞のグルコース消費速度

は、静置培養と比べて低い値を維持した。平均孔径 30 μm の保持粒子はそのマトリックス構造が細かいため、細胞の播種の際、振とう法では細胞が粒子の内部まで侵入できなかったと考えられ、このため細胞は高密度化できないものと思われる。

以上に述べてきたように、PVF 樹脂多孔質体は、比較的安価であり、機械的な強度も大きく、オートクレーブによる滅菌が可能である。このような PVF 樹脂多孔質体のうち比較的孔径の小さいものを細胞保持粒子として用いることにより、複雑な操作を要することなく浮遊性動物細胞を高密度に固定化することができた。したがって、本固定化培養法は、工業的規模でも応用可能なポテンシャルを有するものと考えられる。

3. 4 結論

平均孔径が 30-100 μm の PVF 樹脂多孔質体を細胞保持粒子として用いる浮遊性動物細胞の固定化の可能性を、静置培養および振とう培養において検討した。保持粒子上にマウスミエローマ MPC-11 を懸濁した培地を滴下することにより、また保持粒子を細胞懸濁培地とともに振とうすることにより、細胞を粒子内に 1×10⁶ cells/cm³-BSP 以上の密度で捕捉させることができた。捕捉された細胞は保持粒子のマトリックス内でコロニーを形成することにより物理的に固定化され、粒子内で 1×10⁷ cells/cm³-BSP 程度の高密度培養が容易に達成できることを明らかにした。

参考文献

- 1) Atkinson, B., G.M. Black, P.J.S. Lewis and A. Pinches, *Biotechnol. Bioeng.*, **21**, 193-200 (1979)
- 2) Black, G.M. and C. Webb, in *Process engineering aspects of immobilised cell*

systems (C. Webb, G.M. Black and B. Atkinson, eds), The Institution of Chemical Engineers, Rugby, UK, pp 277-285 (1986)

3) Hayman, E.G., N.G. Ray and P.W. Runstadler, Jr. in *Bioreactors and biotransformations* (G.W. Moody and P.B. Baker, eds), Elsevier, London, pp 132-140 (1987)

4) Laskov, R., R. Lanzerotti and M.D. Scharce, *J. Mol. Biol.*, **56**, 327-339 (1971)

5) 村上浩樹, 無血清細胞培養マニュアル (大野忠夫・村上浩樹編), 講談社サイエンティフィック, pp 14-30 (1989)

6) カネボウ化成株式会社, "カネボウPVAスポンジ"

第4章 固定化動物細胞の循環層型培養槽における長期培養

4.1 緒言

前章では, 平均孔径が 30-100 μm のポリビニルホルマール (PVF) 樹脂多孔質体を細胞保持粒子 (biomass support particles, BSPs) として用いることにより, 浮遊性動物細胞の固定化が可能であり容易に高密度培養が達成できることを, 静置培養および振とう培養において確認した. この固定化法を用いた浮遊性動物細胞の培養を工業的規模のプロセスにまで実用化するためには, 適切なバイオリアクターを開発し, バイオリアクターにおいて長期間にわたる培養が達成できることが不可欠である. また, 培養コストや生産物の分離精製を考えると, このような培養が無血清培地を用いて実現できることが望まれる.

動物細胞は好気性生物であるので, バイオリアクター内で十分な酸素供給が可能でなければならない. 微生物培養においてはバイオリアクター内に直接気泡を吹き込む通気方法が一般的であるが, 動物細胞培養においては過度の通気攪拌は細胞の生育を阻害する. 固定化法を利用すると, 細胞が固定化担体内に保持されるため, 物理的外力に弱い動物細胞を保護することができる. このため, 固定化培養は, 細胞を固定化せずに懸濁状態で培養するのに比べて, バイオリアクターの設計や操作の点で自由度が大きく, 固定化法によっては酸素供給能力の高い直接気泡通気を比較的容易に行なうことができるものと思われる. ハイブリドーマの培養によるモノクローナル抗体の生産においては, 直接気泡通気により生産物のモノクローナル抗体に変性が起こらないことが報告されており^{1,2)}, 直接気泡通気は動物細胞の固定化培養における有望な酸素供給法と考えられる.

さらに, 工業的に使用されるバイオリアクターとしては, スケールアップが容易であり, 雑菌汚染 (コンタミネーション) なく長期培養が可能なように構造

が簡単なものが望ましい。

多孔性の保持粒子に微生物を固定化して培養するためのバイオリアクターとしては、これまで直接気泡通気による気液固3相流動層型のものが広く検討されてきた³⁾。流動層型バイオリアクターは、酸素供給能力が高く構造が簡単であるため工業的規模で応用可能なポテンシャルを有しているものと思われ、保持粒子の種類や微生物の増殖形態に応じていくつかのタイプのものが報告されている^{3,4,5)}。Black ら⁴⁾は、ポリエステルフォームなどの比重の低い保持粒子に適したバイオリアクターとして、リアクター底部の一部分から通気を行なうことにより保持粒子を循環させる循環層型培養槽 (circulating bed fermenter) を開発した。この循環層型培養槽は、比較的少ない通気量で保持粒子をスムーズに流動できることが報告されている。

浮遊性動物細胞を固定化した保持粒子を、過度に激しく流動させると細胞の漏出が懸念される。このため、循環層型培養槽は、PVF 樹脂多孔質体の保持粒子に固定化した浮遊性細胞の培養に適したバイオリアクターであると考えられる。そこで本章では、工業的規模で応用可能なバイオリアクターのプロトタイプとして直接気泡通気による循環層型培養槽を選定し、浮遊性動物細胞の細胞保持粒子への固定化と無血清培地を用いた長期培養について検討した。

4. 2 実験

4. 2. 1 細胞、培地、および細胞保持粒子

浮遊性動物細胞として、マウスミエローマ MPC-11 (ATCC CCL 167) を使用した。

培地は、基本合成培地として RPMI 1640 培地、ダルベッコ変法イーグル培地 (DME)、ハム F12 培地を 2:1:1 の比で混合した RDF 培地 (RPMI 1640, 5.46 g/l; DME, 2.62 g/l; F12, 2.78g/l) に、 NaHCO_3 を 1.05 g/l、HEPES (*N*-(2-

hydroxyethyl)piperazine-*N'*-(2-ethane sulphonic acid)) を 4.77 g/l、ペニシリンを 10^5 units/l、ストレプトマイシンを 0.1 g unit/l、ITES⁶⁾ (インスリン, 5 mg/l; トランスフェリン, 10 mg/l; エタノールアミン, 1.53 mg/l; 亜セレン酸ナトリウム, 4.3 $\mu\text{g/l}$) (極東製薬工業)、牛血清アルブミン (bovine serum albumin, BSA) (伊藤ハム) を 1 または 5 g/l、およびシリコンポリマー系の消泡剤 (Antifoam B emulsion, Sigma) を 0.1 ml/l 添加した無血清培地を用いた。

また、細胞保持粒子として、平均孔径 60 μm 、空隙率 0.88、みかけ密度 0.15 g/cm^3 の PVF 樹脂スポンジシート (カネボウ化成) を $3 \times 3 \times 3$ mm の大きさに切ったものを使用した。

4. 2. 2 循環層型培養槽による培養

培養装置として、Fig. 4.1 に示すようなガラス製の循環層型培養槽を使用した。この循環層型培養槽の上部は内径 45 mm の円筒形になっており、底部は保持粒子の堆積を少なくするために逆斜円錐形とし、直径 15 mm の円形のガラスフィルター (孔径: 100-120 μm) を有する。培養槽内の培養液量は 150 ml とし、保持粒子を 1000 個充填した。したがって、培養槽内の保持粒子の充填率は約 15% となる。加湿した空気を図の Line B 経由で培養槽の底部よりガラスフィルターを通して通気することにより、比較的少ない通気量で保持粒子を緩やかに循環させることができる。また、Line A 経由で培養槽上部に設けた通気ノズルからバブリングすることにより通気することも可能である。通気速度はいずれの場合も 30 ml/min とした。培養槽内の温度は、ジャケットに温水を流すことにより 37°C に維持した。

培養槽の滅菌は、保持粒子とオートクレーブ可能な RPMI 1640 培地を入れた培養槽をオートクレーブすることにより行なった。滅菌後、RPMI 1640 培地を除去し、保持粒子を新鮮培地で洗浄した。細胞の保持粒子への播種は、細胞懸

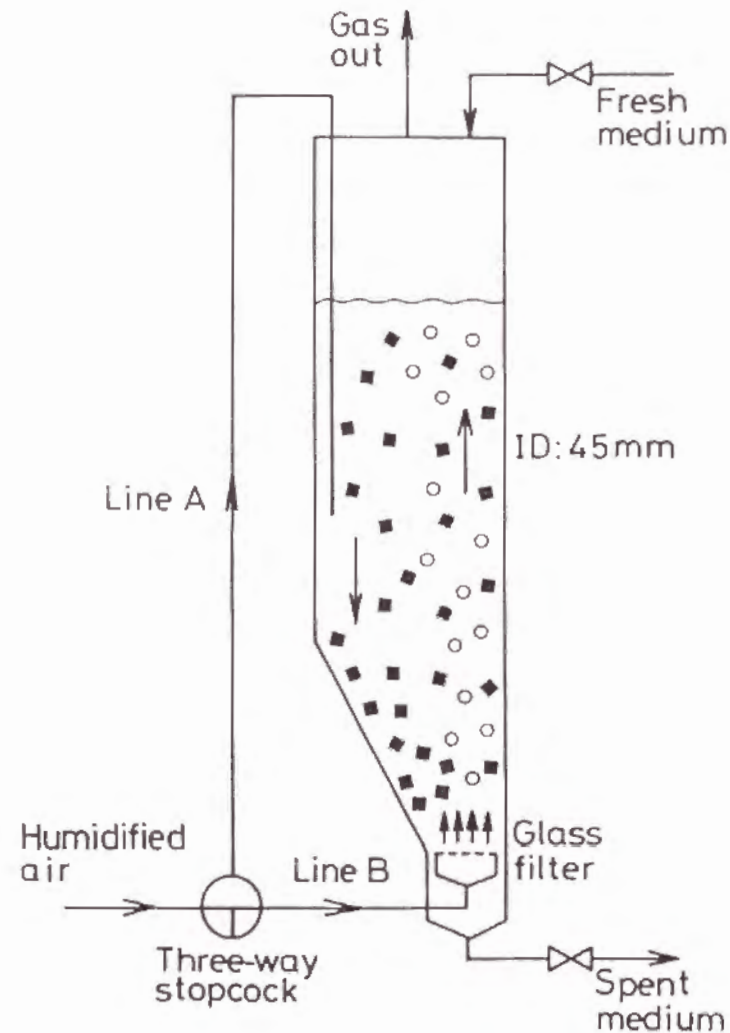


Fig. 4.1. Schematic diagram of the circulating bed fermenter (CBF) system. The fermenter vessel consisted of: a 45 mm-diameter cylindrical section; a base of oblique cone shape; and a 15 mm-diameter glass filter

濁培地を 150 ml 培養槽に入れ、Line B 経由で槽底部から加湿空気を直接気泡通気し、保持粒子を細胞懸濁培地中で循環させることにより行なった。この操作を 4-8 h 行なった後、細胞懸濁培地を除去し、新鮮培地 150 ml を培養槽上部から槽内に注入して培養を開始した。

播種した細胞の培養は、次のように 2 通りの方法で行なった。すなわち、(1) Line B 経由で培養槽底部からの直接気泡通気による保持粒子の循環をそのまま継続するか、あるいは (2) 最初の 5 日間は Line A 経由で培養槽上部に設けたノズルからバブリングしながら通気することにより静的に培養を行ない、その後 Line B 経由の通気に切りかえ保持粒子を循環させながら培養した。いずれの場合も、培養槽底部から培養液を全量排出した後、培養槽上部から新鮮培地を 150 ml 注入する方法で、定期的に培地を交換する繰返し回分培養を行なった。

4. 2. 3 分析方法

培養終了時における固定化生細胞密度の推定は、Mosmann⁷⁾の開発した MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) を用いる比色定量法に基づいて、次のように行なった。ダルベッコのリン酸緩衝食塩水に MTT (同仁化学研究所) を 5 g/l の濃度で溶かしたものを孔径 0.22 μm のフィルターでろ過し、MTT 溶液を調製した。固定化していない細胞を懸濁した培地 3 ml あるいは細胞を固定化した保持粒子 2 個を新鮮培地 3 ml に入れたものに、MTT 溶液を 0.3 ml 加え、37°C で 4 h インキュベートした。次に、これに 3 ml の 2-プロパノールを加え超音波処理することで、生細胞内の酵素活性により生成した MTT formazan (1-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-3,5-diphenyl formazan) を溶解した。この溶液を遠心分離して得た上清の吸光度を 560 nm と 700 nm において測定し、吸光度の差を求めた。固定化していない細胞の細胞数と吸光度差との関係を検量線として、固定化生細胞密度を算出した。

固定化していない細胞の生細胞密度は、細胞懸濁培地に 0.2% トリパンブルー溶液を 9:1 の比で加えた後、未染色細胞を顕微鏡下 Burkert Turk 型血球計算板にて計数することにより測定した。培養液中のグルコース濃度は、グルコースアナライザー (Beckman Instruments) を用いて測定した。

4. 3 結果と考察

4. 3. 1 保持粒子への細胞の播種

保持粒子を入れた培養槽に細胞懸濁培地を加え、槽底部から直接気泡通気を行ない、保持粒子を細胞懸濁培地中で循環させることにより、培養槽の内部で直接細胞を保持粒子に播種できるかどうかを試みた。Fig. 4.2 は、この細胞播種操作の際の細胞懸濁培地中の生細胞密度の経時変化を、後に述べる 3 つの培養について、それぞれ示したものである。図にみられるように、細胞懸濁培地中の細胞密度は時間とともに減少し、4-8 h の間に初期細胞密度の 1/10 以下となった。この間、細胞の生存率はほとんど低下しなかった。この間の細胞の増殖は無視することができ、また減少した細胞がすべて保持粒子に捕捉されたとして、播種操作前後の培地中の生細胞密度より固定化生細胞密度を計算すると、 $1.7\text{--}6.9 \times 10^6 \text{ cells/cm}^3\text{-BSP}$ となった。以上のことから、保持粒子を細胞懸濁培地中で循環させることにより、培養槽内で細胞を保持粒子に効率よく播種できることがわかった。

4. 3. 2 培養初期より保持粒子の循環を行なう培養

細胞を保持粒子に播種した後は、培養槽底部からの直接気泡通気により保持粒子を循環させながら、2-3 日毎に培地を全量新鮮培地と交換する繰返し回分培養を行なった。保持粒子内の細胞密度を直接測定することができないので、ここでは細胞のグルコースの消費を測定することにより間接的に細胞の増殖を

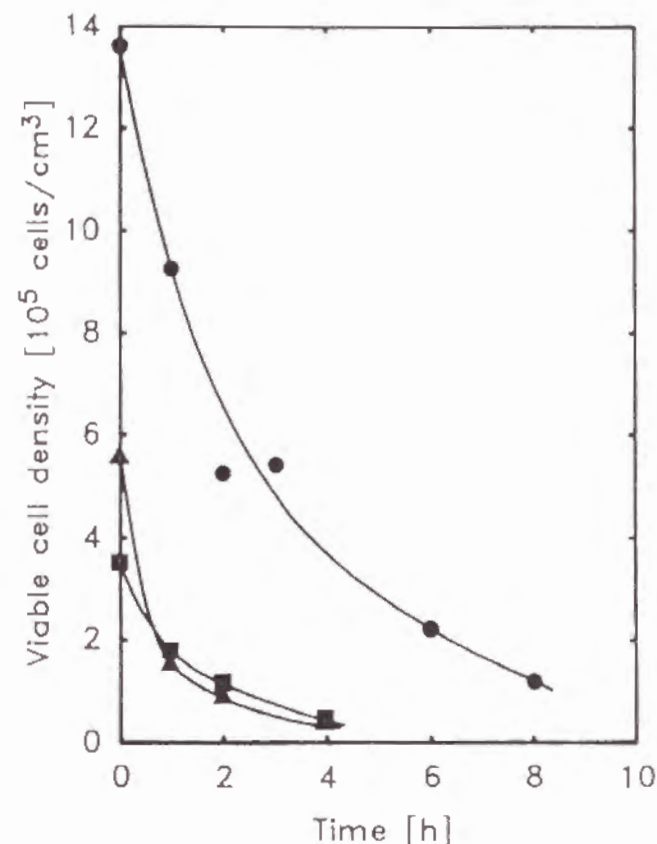


Fig. 4.2. Time course of MPC-11 cell density in the culture medium during the inoculation procedure: ▲, corresponding to the incubation shown in Fig. 4.3; ●, Fig. 4.4; ■, Fig. 4.5. Initial entrapped cell densities in biomass support particles (BSPs) were 2.88×10^6 , 6.91×10^6 , and $1.69 \times 10^6 \text{ cells/cm}^3\text{-BSP}$, respectively

追跡した。BSA を 0.1 あるいは 0.5% (w/v) 添加した無血清培地を用いた培養を行なったが、それぞれの培養における培養液中のグルコース濃度の経時変化を Fig. 4.3 および Fig. 4.4 に示す。これらの図において、1 点鎖線で示す時刻に培地交換を行なっており、1 点鎖線で区切られた期間が 1 回の回分培養期間を示

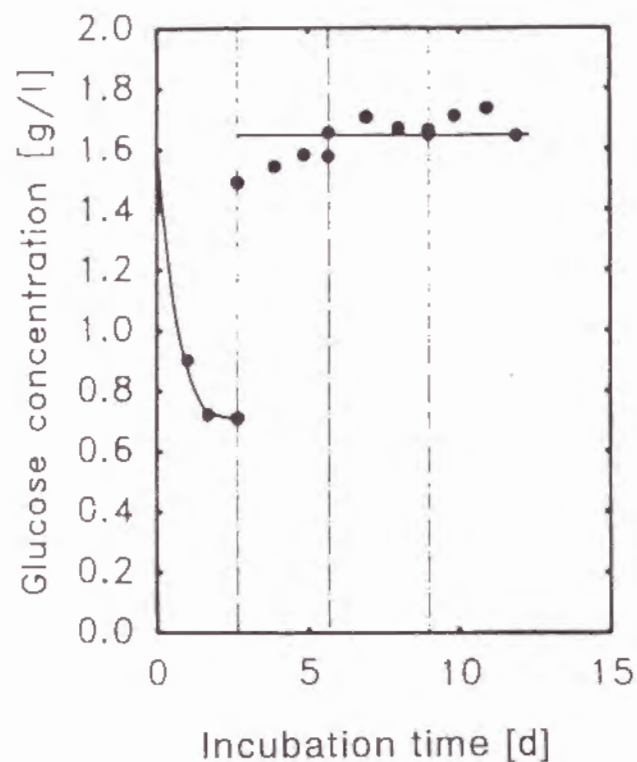


Fig. 4.3. Time course of glucose consumption in culture medium containing 0.1% (w/v) bovine serum albumin (BSA) when entrapped cells within BSPs were circulated in the CBF from the initial period

す。また Fig. 4.4 において、各回分培養期間においてグルコース濃度の経時変化を表わす曲線の始点は、培地交換の際保持粒子の空隙内には前回の回分培養終了時の培地がそのまま残存しており、これが新たに注入した新鮮培地と培養槽内で完全に混合するものとして、グルコース濃度を計算したものである。また、グルコース濃度の経時変化を示す曲線の接線の傾きが、細胞のグルコース消費速度を表わしている。

図にみられるように、固定化細胞のグルコース消費は、無血清培地中の BSA

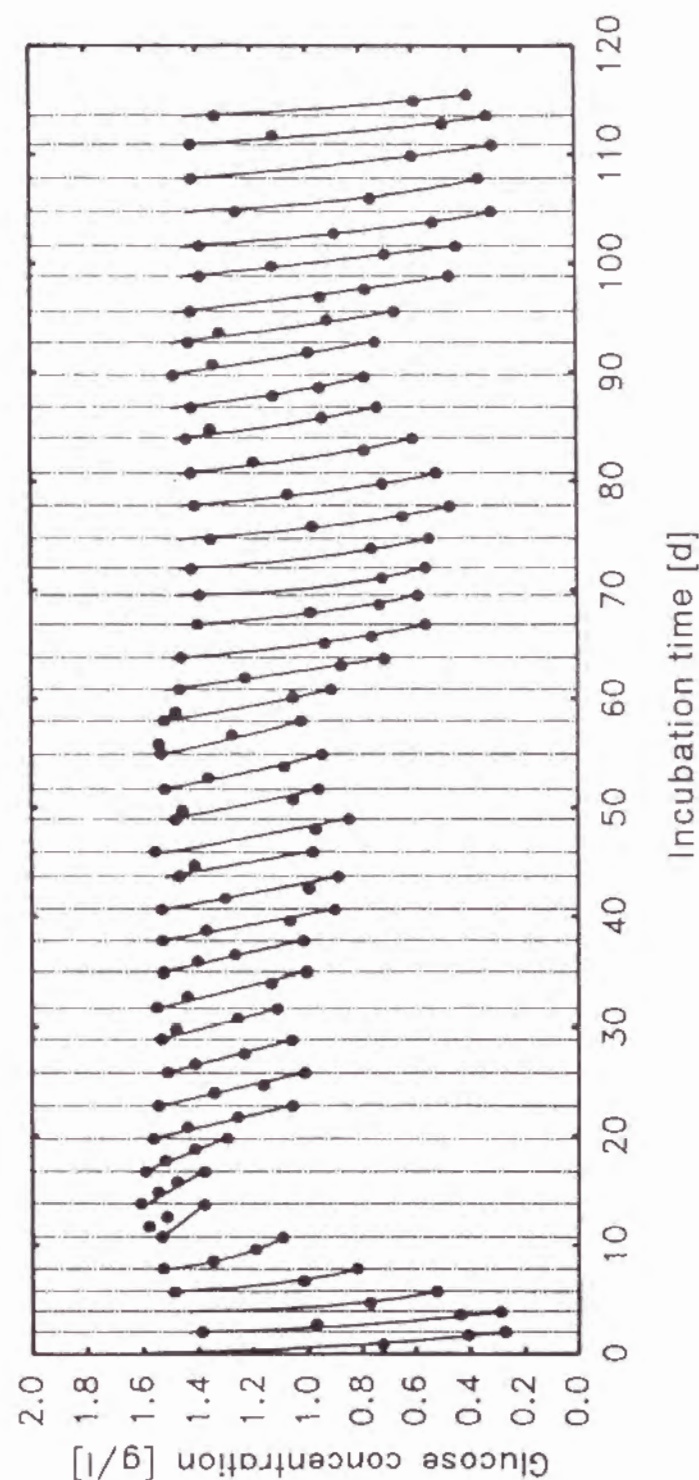


Fig. 4.4. Time course of glucose consumption in culture medium containing 0.5% (w/v) BSA when entrapped cells within BSPs were circulated in the CBF from the initial period

濃度により顕著な影響を受けた。すなわち、BSA を 0.1% 添加した培地を用いた場合、培養 2 日目までは培地中のグルコース濃度が減少しており、細胞はグルコースを消費していることがわかるが、培養 3 日目以降、グルコース濃度はほぼ一定となり、グルコースの消費はみられなくなった。よって、生細胞は保持粒子内に存在しなくなったものと思われる。一方、BSA を 0.5% 添加した培地を用いると、培養初期においては 0.1% BSA 添加培地での培養結果と同様に、グルコース濃度の経時変化を示す曲線の接線の傾きは次第に小さくなり、グルコース消費速度は一旦低下したが (1-17 d)、その後の培養経過はまったく異なり、グルコース消費速度は増加に転じた。

培養初期における細胞のグルコース消費速度の減少は、この間培地中に比較的多くの細胞が観察されたことから、播種した細胞は保持粒子にしっかりと固定化されておらず、細胞が保持粒子から徐々に漏れ出し、これらが死滅する、あるいは培養系外に排出されることにより起こるものと考えられる。

また、使用した MPC-11 は、固定化していない細胞の静置培養では、0.1% BSA 添加培地でも 0.5% BSA 添加培地と同等の増殖を示すのだが、バイオリアクターを用いる培養においては、上に述べたように BSA の培地への添加量により培養結果に著しい違いがみられた。一般に、動物細胞は培地の流動にともなう剪断力や通気により発生する気泡により生育障害を受ける。無血清培地を用いる培養においてはこのような生育障害が顕著であり、これに対しリン脂質⁸⁾、Pluronic F68⁹⁾、BSA¹⁰⁾ などの培地への添加は細胞に対する保護効果を示すことが報告されている。ここで使用した無血清培地は BSA を含むものであるが、直接気泡通気をともなう培養条件下において、BSA の 0.1% の添加では保護効果が不十分なために保持粒子から漏出した細胞は死滅してしまい、生細胞は保持粒子内に固定化されなかったものと思われる。一方、BSA を 0.5% 添加した培地を用いると、BSA の保護効果がはたらくため漏出した細胞も生存でき、培養

の経過につれて保持粒子のマトリックス内にしっかりと固定化された細胞が生じ、これらの細胞が粒子内で増殖し始めることにより、グルコース消費速度が増加に転じたものと考えられる。

4. 3. 3 保持粒子を静置後循環させる 2 段階培養

以上の検討では、細胞の保持粒子への播種後直ちに直接気泡通気による保持粒子の流動を行なったが、細胞の保持粒子への固定化はあまり効率のよいものではなかった。これに対し、細胞の播種後しばらくは保持粒子を流動させずに静的に培養し、細胞が保持粒子の内部でコロニーを形成できるようにしてやれば、細胞の固定化をより効率的に達成できるものと期待される。そこで次に、細胞の播種後の培養を以下に述べるように 2 段階で行なうことを試みた。すなわち、先程と同様の方法で細胞を保持粒子に播種した後、まず最初の 5 日間は、Fig. 4.1 の Line A 経路で培養槽上部のノズルからバブリングしながら通気することにより、捕捉された細胞が保持粒子内でコロニーを形成できるよう、静的に培養を行なった。その後、Line B 経路の直接気泡通気に切りかえ保持粒子を流動させながら、1 回の回分操作が約 1 日の繰返し回分培養を継続した。なお、培地は BSA を 0.5% 添加したものを使用し、その他の培養条件は上に述べた検討と同様である。

培養結果を Fig. 4.5 に示す (なお、Fig. 4.4 と同様に、各回分培養期間においてグルコース濃度の経時変化を表わす曲線の始点は、培地交換の際保持粒子の空隙内には前回の回分培養終了時の培地がそのまま残存しており、これが新たに注入した新鮮培地と培養槽内で完全に混合するものとして、グルコース濃度を計算したものである)。図にみられるように、培養開始当初の静的に培養している期間グルコース消費速度は増加したが (1-5 d)、直接気泡通気による保持粒子の流動を始めると、上述の培養と同様比較的多くの細胞の漏出がみられ、細

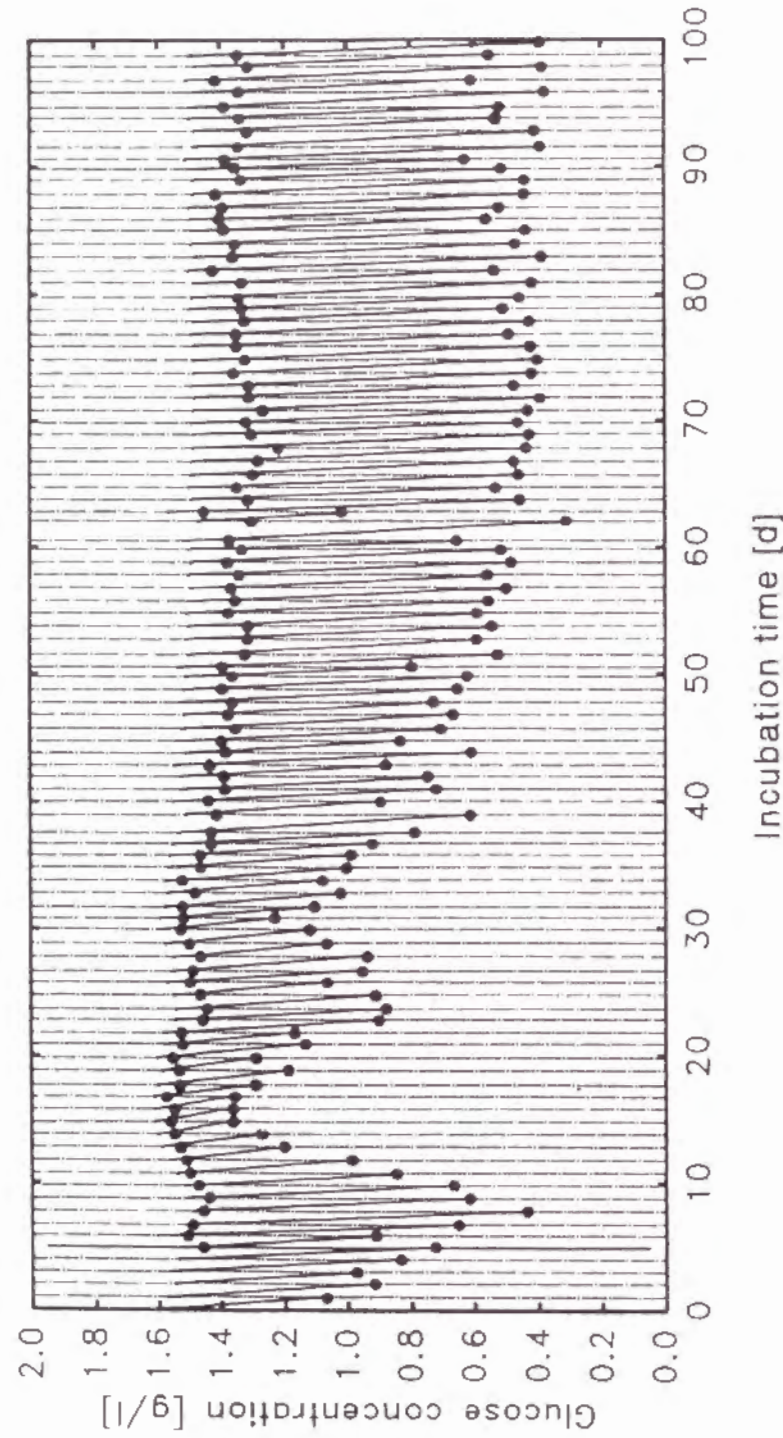


Fig. 4.5. Time course of glucose consumption in culture medium containing 0.5% (w/v) BSA when inoculated cells within BSPs were statically incubated for 5 days before circulating the BSPs

胞のグルコース消費は一旦低下した (8-17 d). その後, 細胞の漏れは 10^4 cells/cm³ 程度にまで減少し, グルコース消費速度も増加に転じた. 細胞の播種後直ちに保持粒子の流動を行なった Fig. 4.4 の培養結果と比較すると, Fig. 4.5 ではグルコース消費速度は全般に大きくなっており, これは培養初期に静的な培養を行なったことにより保持粒子にしっかりと固定化された細胞数が増加したためと考えられる. さらに培養後半においては, グルコース消費速度は非常に大きいものとなった (40-100 d). MTT を用いる比色定量法により培養終了後の保持粒子内の生細胞密度を推定すると, $1.0-1.2 \times 10^7$ cells/cm³-BSP ($n = 4$) に達していた. 保持粒子内で生成した MTT formazan は完全には溶解しなかったため, 実際の固定化生細胞密度はもう少し高いものと思われる.

以上のことから, PVF 樹脂多孔質体の細胞保持粒子を用いる浮遊性動物細胞の固定化法は, 直接気泡通気をともなうバイオリクターにおいても長期にわたる高密度培養を達成可能なことがわかった. 細胞保持粒子を用いる固定化培養では, 細胞の保持粒子への固定化が培養初期にバイオリクター内で自然に行なえるため, ゲルやカプセルに細胞を人為的に固定化した後にこれらをリアクター内に充填するゲル包括法やマイクロカプセル法に比べて, 非常にシンプルである. また, アルギン酸カルシウムゲル包括法では固定化担体粒子の強度が培養の経過につれてしだいに小さくなるのに対し, PVF 樹脂多孔質体の細胞保持粒子は直接気泡通気をともなう 100 日間以上の培養後も全く変化がなく, 長期培養に耐え得るものであった. さらに, 循環層型培養槽は, その構造上スケールアップや培養環境の制御も比較的容易であると考えられる. したがって, 細胞の保持粒子への固定化の効率化やリアクター内における保持粒子の充填率を増大させることについては, 今後検討の必要があるが, 細胞保持粒子と循環層型培養槽を用いる固定化培養システムは, 工業的利用を考えると有利なプロセスを提供できるものと期待される.

4. 4 結論

底部から直接気泡通気することにより固定化担体粒子を緩やかに循環させる循環層型培養槽を用いて、PVF 樹脂多孔質体の細胞保持粒子に固定化したミエローマの無血清培地を用いた長期培養について検討した。細胞懸濁培地中で保持粒子を循環させることにより細胞を粒子に播種したが、培養初期においては細胞の漏出が著しく、細胞のグルコース消費速度は一旦低下した。その後、細胞の漏れは減少し、グルコース消費速度も増加に転じた。細胞の播種後数日間のみ培養槽の上部でバブリングにより通気することで静的に培養した後、保持粒子を循環させる2段階培養を行なうと、細胞のグルコースの消費速度は非常に大きくなり、少なくとも 1×10^7 cells/cm³-BSP 以上の高細胞密度化と 100 日間程度の長期培養が達成できた。

参考文献

- 1) Birch, J.R., R.B. Boraston and L. Wood, *Trends Biotechnol.*, **3**, 162-166 (1985)
- 2) Yoshida, H., M. Kamihira, S. Iijima and T. Kobayashi, *J. Chem. Eng. Jpn.*, **22**, 282-286 (1989)
- 3) Black, G.M. and C. Webb, in *Process engineering aspects of immobilised cell systems* (C. Webb, G.M. Black and B. Atkinson, eds), The Institution of Chemical Engineers, Rugby, UK, pp 277-285 (1986)
- 4) Black, G.M., C. Webb, M. Matthews and B. Atkinson, *Biotechnol. Bioeng.*, **26**, 134-141 (1984)
- 5) Webb, C., H. Fukuda and B. Atkinson, *Biotechnol. Bioeng.*, **28**, 41-50 (1986)
- 6) Murakami, H., H. Masui, G.H. Sato, N. Sueoka, T.P. Chow, T. Kano-Sueoka, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 1158-1162 (1982)

- 7) Mosmann, T., *J. Immunol. Methods*, **65**, 55-63 (1983)
- 8) Murakami, H., T. Edamoto, K. Shinohara and H. Omura, *Agric. Biol. Chem.*, **47**, 1835-1840 (1983)
- 9) Handa, A., A.N. Emery and R.E. Spier, *Dev. Biol. Standard*, **66**, 241-253 (1987)
- 10) Hülshuer, M. and U. Onken, *Biotechnol. Lett.*, **10**, 689-694 (1988)

第5章 固定化動物細胞の静置・振とう培養下における増殖・死滅挙動

5.1 緒言

これまで検討してきた固定化動物細胞は、生きた細胞を担体に固定化し、栄養分や酸素を供給することにより細胞を担体内で増殖させるものである。このような固定化増殖細胞を用いる生物反応プロセスにおいて、固定化細胞の増殖挙動を定量的、速度論的に把握することは、細胞の高密度化やバイオリアクターの合理的設計、最適操作に向けて重要な課題である。

固定化増殖微生物と同様に、固定化動物細胞の場合も、固定化担体の表面近傍における細胞の増殖にともない、担体の中心付近では溶存酸素などが不足するようになり、担体中心付近の細胞は死滅する^{1,2)}。また、第1章や第3章で述べたように、細胞の固定化担体粒子からの漏出も起こる。したがって、固定化細胞の増殖挙動を把握するためには、固定化生細胞密度のみならず、担体内における固定化生細胞の分布、死滅した細胞数、および担体から漏出した細胞数を知る必要がある。

固定化細胞密度の測定は、たとえばゲル包括法の場合、ゲルを溶解して生細胞数を計数すればよく比較的簡単であるが、細胞保持粒子 (biomass support particles, BSPs) を用いる固定化法の場合、細胞を回収して直接生細胞数を数えることは不可能である。このため、第3章、第4章では栄養分の消費や物質生産の経時変化を測定することにより細胞の増殖を間接的に追跡していたが、より直接的な固定化生細胞密度の評価法が望まれる。

Mosmann³⁾の開発した MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) アッセイは、生細胞のミトコンドリア内の酵素による物質変換能を利用し、黄色の MTT から紫色の MTT formazan (1-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-3,5-diphenyl formazan) への変換量を比色定量することによ

り生細胞数を推算するものである。死細胞はこの変換を行なうことができない。この MTT アッセイは原理的に、細胞保持粒子に固定化された生細胞密度の測定にも適用できると考えられる。さらに、保持粒子内における生細胞の分布も把握できるものと期待される。

また、乳酸脱水素酵素 (lactate dehydrogenase, LDH) は本来細胞内に存在する酵素であるが、細胞死にともない培地中への遊離が起こる。LDH の培地への遊離量を測定することにより、培養中の細胞の生存率の変化⁴⁾や通気攪拌による細胞の破壊の度合⁵⁾を把握できることが報告されている。この LDH の培地への遊離量の測定も、細胞保持粒子を用いる固定化細胞の培養において死滅細胞数の把握に利用できるものと思われる。

本章では、細胞保持粒子に固定化した細胞の静置培養および振とう培養を行ない、固定化細胞の MTT 変換活性や LDH の培地への遊離量を測定することにより、固定化細胞の増殖挙動を把握することを試みた。

5.2 実験

5.2.1 細胞、培地、および細胞保持粒子

浮遊性動物細胞として、マウスミエローマ MPC-11 (ATCC CCL 167) を使用した。

培地は、基本合成培地として RPMI 1640 培地、ダルベッコ変法イーグル培地 (DME)、ハム F12 培地を 2:1:1 の比で混合した RDF 培地 (RPMI 1640, 5.46 g/l; DME, 2.62 g/l; F12, 2.78g/l) に、NaHCO₃ を 1.05 g/l, HEPES (N-(2-hydroxyethyl)piperazine-N'-(2-ethane sulphonic acid)) を 4.77 g/l, ペニシリンを 10⁵ units/l, ストレプトマイシンを 0.1 g unit/l, ITES (インスリン, 5 mg/l; トランスフェリン, 10 mg/l; エタノールアミン, 1.53 mg/l; 亜セレン酸ナトリウム, 4.3 μg/l), および牛血清アルブミンを 5 g/l 添加した無血清培地を用いた。

また、細胞保持粒子として、平均孔径 60 μm 、空隙率 0.88、みかけ密度 0.15 g/cm^3 のポリビニルホルマール (PVF) 樹脂スポンジシート (カネボウ化成) を $2 \times 2 \times 2 \text{ mm}$ および $3 \times 3 \times 3 \text{ mm}$ の大きさに切ったものを使用した。

5. 2. 2 細胞の播種と培養

50 ml 容量のねじ口三角振とうフラスコ (柴田科学) に 1 cm^3 分の保持粒子 ($3 \times 3 \times 3 \text{ mm}$ の保持粒子は 40 個/フラスコ、 $2 \times 2 \times 2 \text{ mm}$ の保持粒子は 135 個/フラスコ) を入れ、これに指数増殖期にある細胞懸濁培地 10 ml を加え、往復振とう恒温槽にて大気中で 24 h 振とうすることにより (振とう速度, 80 min^{-1} ; 振幅, 4 cm; 培養温度, 37°C)、細胞を保持粒子に播種した。

細胞の播種後、細胞懸濁培地を除去し、(1) 新鮮培地を 10 ml 加えて、そのまま振とう培養を継続するか、あるいは (2) 保持粒子を直径 60 mm のペトリディッシュ (岩城硝子) に移し新鮮培地を 10 ml 加え、 CO_2 インキュベーター ($5\% \text{ CO}_2$, 37°C) 内で静置培養を行なった。振とう培養、静置培養のいずれも、毎日培地を 10 ml 全量新鮮培地と交換しながら培養を継続した。なお、固定化生細胞密度と保持粒子内の生細胞分布を評価するために、培養中適宜、保持粒子のサンプリング ($3 \times 3 \times 3 \text{ mm}$ の保持粒子は 4 個/サンプリング、 $2 \times 2 \times 2 \text{ mm}$ の保持粒子は 13 個/サンプリング) を行なった。また、漏出細胞数および培地中に遊離した LDH 活性の測定のために、前回の培地交換後 24 h 経過した培養液もサンプリングした。

5. 2. 3 MTT 変換活性の測定と固定化生細胞の染色

固定化していない細胞および保持粒子に固定化された細胞の MTT 変換活性は、Denizot ら⁶⁾ の方法に基づき次のように測定した。すなわち、(1) 固定化していない細胞 (細胞懸濁培地を遠心分離して培地を除いたもの) または (2) 細胞を固

定化した保持粒子 ($3 \times 3 \times 3 \text{ mm}$ の保持粒子は 3 個、 $2 \times 2 \times 2 \text{ mm}$ の保持粒子は 10 個) に、MTT 溶液 (MTT, 1 g/l ; RPMI 1640, 5.46 g/l ; DME, 2.62 g/l ; F12, 2.78 g/l ; NaHCO_3 , 1.05 g/l ; HEPES, 4.77 g/l ; これらを溶解した後、孔径 0.22 μm のフィルターでろ過したもの) を 3 ml ずつ加え、 37°C で 4 h インキュベートした。反応終了後、(1) 固定化していない細胞の場合、遠心分離してから未反応の MTT 溶液を吸引除去し、(2) 固定化細胞の場合、そのまま吸引により MTT 溶液を除去した。これらに 2-プロパノールを 6 ml 加えて激しく攪拌し、生成した MTT formazan を溶解した。この溶液の 560 nm と 700 nm における吸光度を測定し、吸光度の差を求めた。

保持粒子内の生細胞分布は、MTT 溶液を加えて 37°C で 4 h 反応させた後の保持粒子をダルベッコのリン酸緩衝食塩水 (PBS) で洗浄し、カミソリで切断した粒子の断面を実体顕微鏡で観察することにより把握した。

5. 2. 4 LDH 活性の測定

サンプリングした漏出細胞懸濁培地を遠心分離して細胞を除去した上清の LDH 活性は、市販のキット (和光純薬工業) を用いて NADH (nicotinamide adenine dinucleotide, reduced form) の減少量を比色定量することにより測定した。固定化していない細胞の細胞内 LDH 活性は、遠心分離により培地を除去した細胞にダルベッコの PBS に溶解した 0.5% (v/v) Triton X-100 (polyethylene glycol mono-p-isooctylphenyl ether) 3 ml を加えて細胞を破壊した後に測定を行なった。

5. 2. 5 固定化していない細胞の生細胞密度の測定

固定化していない細胞の生細胞密度は、細胞懸濁培地に 0.2% トリパンブルー溶液を 9:1 の比で加えた後、未染色細胞を顕微鏡下 Burker Turk 型血球計算板にて計数することにより測定した。

5. 3 結果と考察

5. 3. 1 MTT 変換活性の測定による固定化生細胞密度の推定

静置培養中の異なる細胞密度にある固定化していない MPC-11 について、それらの細胞懸濁培地を遠心分離して培地を除去することにより、それぞれ種々の細胞数に調整したものに MTT を加え、生成した MTT formazan の吸光度を測定した結果を、Fig. 5.1 に示す。図にみられるように、静置培養中の生細胞密

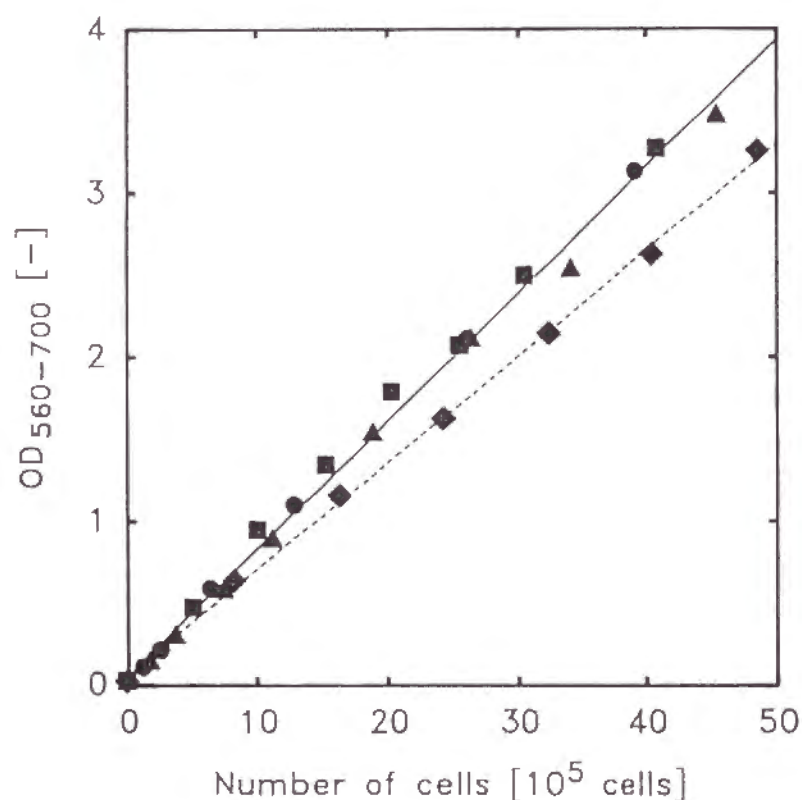


Fig. 5.1. Relationship between number of viable MPC-11 cells taken at different cell densities over the course of a static T-flask culture and absorbance of 1-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-3,5-diphenyl formazan (MTT formazan). The viable cell density was: ●, 1.3×10^5 ; ■, 3.8×10^5 ; ▲, 1.0×10^6 ; ◆, 1.6×10^6 cells/cm³. OD₅₆₀₋₇₀₀, optical density at 560-700 nm

度が 1×10^6 cells/cm³ 以下の指数増殖期にある細胞 (図中, ●, ■, および ▲ のキーで示す) においては、生細胞数と MTT formazan の生成量との関係は同一の直線上にあることから、細胞 1 個あたりの MTT 変換活性、すなわち MTT 変換比活性は一定の値であることがわかる。しかしながら、静止期に至った細胞 (図中, ◆ のキーで示す) においては、生細胞数と MTT formazan の生成量との関係は一本の直線上にあるものの、その傾きは指数増殖期における直線の傾きと比べて小さくなり、MTT 変換比活性は低下することがわかる。また、本章で設定した振とう条件下において固定化していない細胞の振とう培養を行なうと、細胞の増殖速度と生存率は静置培養に比べて大きく低下した。よって以下の検討では、静置培養中の固定化していない細胞の指数増殖期における MTT 変換比活性の値を Fig. 5.1 の直線の傾きより求め、この値を用いて、保持粒子に固定化された細胞の MTT 変換活性から固定化生細胞密度を推算した。

細胞の保持粒子への播種は、細胞懸濁培地中に保持粒子を入れて振とうすることにより行なったが、保持粒子に捕捉された初期細胞密度を細胞の MTT 変換活性から推定した。また、播種操作後の細胞懸濁培地の細胞密度とコントロールとして保持粒子なしで振とうした培地の細胞密度とから、保持粒子に捕捉された初期細胞密度を算出した。両者の結果を比較したものを Table 5.1 に示す。なお、これらの初期細胞密度は、後に Fig. 5.3 および Fig. 5.4 に結果を示す培養に対応するものである。表にみられるように、細胞数の収支から算出した値と細胞の MTT 変換活性から推定した値はほぼ一致している。また、アガロースゲルに固定化されたハイブリドーマの場合も、MTT formazan の生成量は生細胞数と正比例の関係にあることが報告されている⁷⁾。よって、細胞の MTT 変換活性に基づく生細胞数の推定法は、保持粒子内の固定化生細胞密度を評価するのに妥当なものであると思われる。

Table 5.1. Comparison of initial density of cells entrapped within biomass support particles (BSPs) evaluated by two methods

Culture method	BSP size	Initial entrapped cell density ^a [10 ⁶ cells/cm ³ -BSP]	
		Calculated by counting cell number ^b	Measured by MTT assay
Static	3 × 3 × 3 mm	3.3	3.0
	2 × 2 × 2 mm	3.0	2.7
Shake-flask	3 × 3 × 3 mm	3.1	2.3
	2 × 2 × 2 mm	2.5	2.0

^a Corresponding to the incubation shown in Figs. 5.3 and 5.4

^b Calculated by counting cell numbers in the flasks with and without BSPs after the inoculation procedure

5. 3. 2 固定化していない細胞の細胞内 LDH 活性

LDH は、本来細胞内に存在する酵素である。したがって、これが培地中に遊離してくることは細胞膜が損傷していることを意味し、培地中の LDH 活性は細胞死の度合を示す指標となる⁴⁾。静置培養中の異なる細胞密度にある固定化していない MPC-11 について、それらの細胞懸濁培地を遠心分離して培地を除去することにより、それぞれ種々の細胞数に調整したものに界面活性剤 (Triton X-100) を加えて細胞を溶解し、LDH 活性を測定した結果を **Fig. 5.2** に示す。図にみられるように、細胞数と LDH 活性との関係は同一の直線上にあることから、固定化していない細胞の静置培養においては、細胞 1 個あたりの細胞内 LDH 活性、すなわち細胞内 LDH 比活性は一定であることがわかる。

また、本章で設定した条件下において MPC-11 由来の LDH を含む培養上清を振とうすることにより、LDH の安定性を検討した。その結果、MPC-11 由来

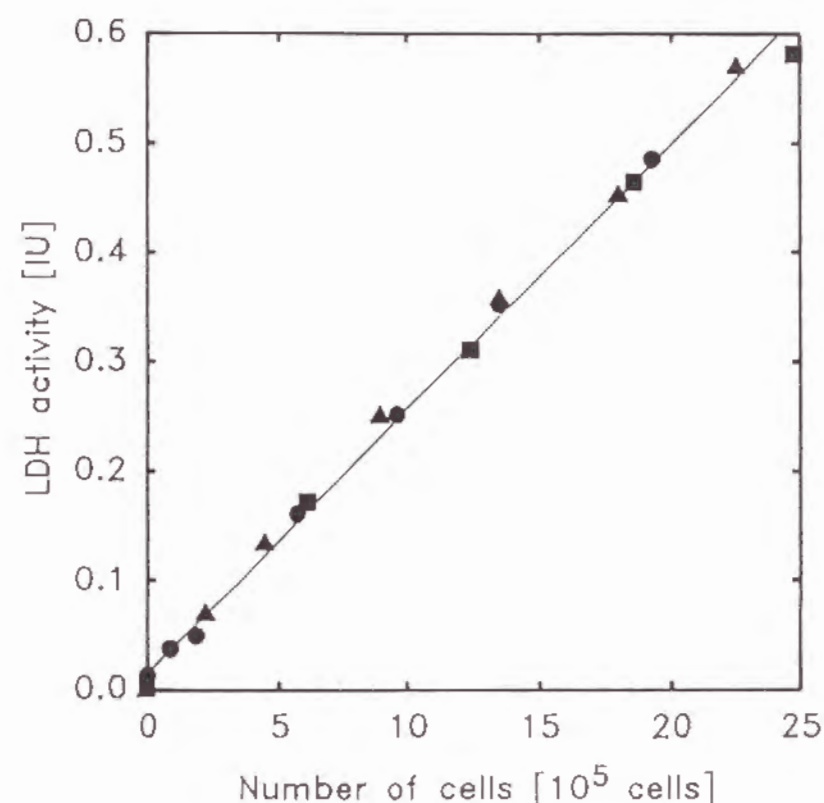


Fig. 5.2. Relationship between number of viable MPC-11 cells taken at different cell densities over the course of a static T-flask culture and intracellular lactate dehydrogenase (LDH) activity of cells lysed in 0.5% Triton X-100 in phosphate buffered saline. The viable cell density was: ●, 1.9×10^5 ; ■, 4.5×10^5 ; ▲, 1.2×10^6 cells/cm³

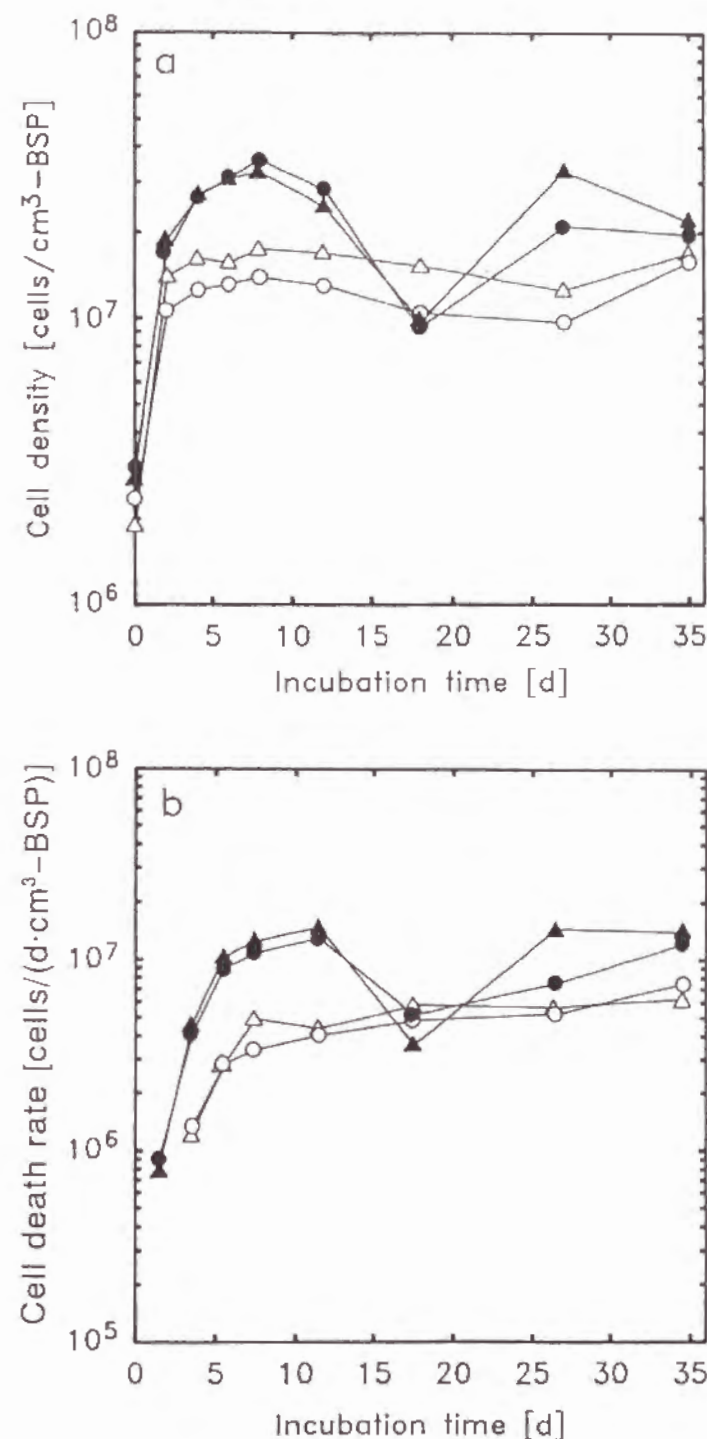
の LDH はきわめて安定であり、LDH 活性の低下は 1 日あたり 1% 以下であることがわかった。よって、以下の検討では、LDH の失活を考慮せず、Fig. 5.2 の直線の傾きより求めた、静置培養中の固定化していない細胞の細胞内 LDH 比活性の値を用いて、培地中の LDH 活性から、固定化細胞の死滅速度 (24 h あたりの死滅細胞数) を算出した。

5. 3. 3 静置・振とう培養下における固定化細胞の増殖挙動

保持粒子に固定化した細胞の静置培養および振とう培養を行ない、(1) 固定化細胞の MTT 変換活性から固定化生細胞密度を推算し、(2) 培地中に遊離した LDH の活性から固定化細胞の死滅速度を求めた。また、(3) 振とう培養においては、培地中に漏出した細胞数から細胞の漏出速度を求めた。

まず、固定化細胞の MTT 変換活性から推定した固定化生細胞密度の経時変化を Fig. 5.3a に示す。なお、Fig. 5.3a-c の培養結果は、いずれもフラスコ 3 本の平均値である。Fig. 5.3a にみられるように、保持粒子内の固定化生細胞密度は、培養開始後急激に増加した後、静置培養の場合 1×10^7 cells/cm³-BSP を越えたあたりで、また振とう培養の場合 $2-3 \times 10^7$ cells/cm³-BSP で飽和に達した。全般的な傾向としては、静置培養に比べて振とう培養の方がより高い固定化細胞密度が得られ、また $3 \times 3 \times 3$ mm の保持粒子に比べて $2 \times 2 \times 2$ mm の保持粒子の方がより高い固定化細胞密度が得られた。また、振とう培養の場合、固定化生細胞密度は培養 18 日目に一旦大きく低下しており、細胞密度の振動現象がみられるのが特徴的である。

培地中の LDH 活性から求めた細胞の死滅速度、すなわち保持粒子 1 cm³ あたりにおいて 1 日間に死滅した細胞数の経時変化を Fig. 5.3b に示す。Fig. 5.3a の固定化生細胞密度の経時変化と比較すると、細胞の死滅速度は、固定化細胞密度の増加にほぼともなうかたちで上昇していることがわかる。また、特に振とう培養の場合、細胞密度が飽和に達して以降、細胞の死滅速度は高い値を維持していることから、保持粒子内で細胞の増殖と死滅が非常に活発に起こっているものと思われる。よって、このことから、細胞の死滅は固定化細胞の増殖挙動に大きく影響していることがわかる。(なお、詳細にみると、固定化生細胞密度が若干低下した培養 12 日目においても、細胞の死滅速度は低下しておらず、固定化細胞密度が低下する直前には細胞の死滅が活発に起こっている可能性が



(Fig. 5.3a, b)

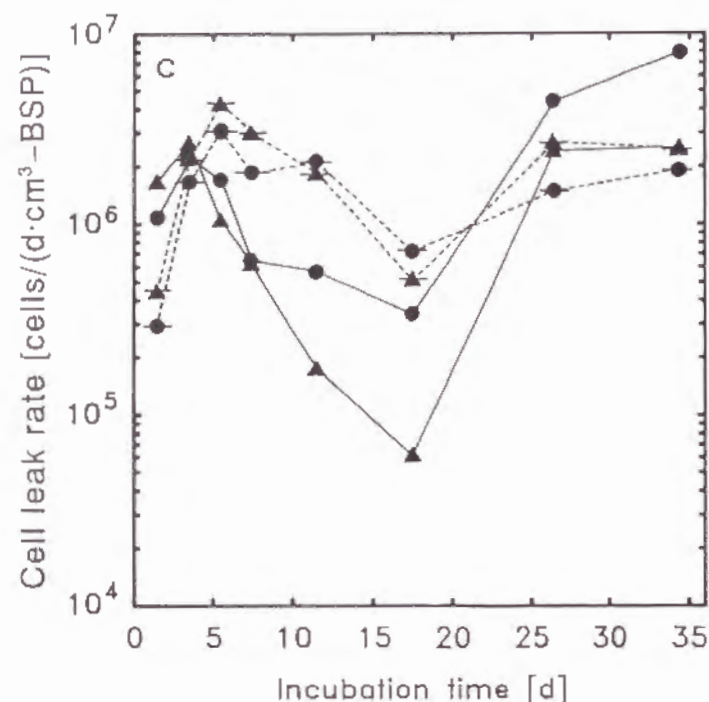


Fig. 5.3a-c. Growth, death, and leakage of immobilized cells within biomass support particles (BSPs) in static and shake-flask cultures. **a** A time course of density of viable cells entrapped within BSPs evaluated by MTT assay: ○, 3×3×3 mm BSPs in static culture; △, 2×2×2 mm BSPs in static culture; ●, 3×3×3 mm BSPs in shake-flask culture; ▲, 2×2×2 mm BSPs in shake culture. **b** A time course of death rate of entrapped cells within BSPs assessed by release of LDH into the culture medium. Symbols are the same as above. **c** A time course of the number of cells leaked from 1 cm³ BSPs per day in a shake-flask culture: ●, viable cells from 3×3×3 mm BSPs; ▲, viable cells from 2×2×2 mm BSPs; —●—, dead cells from 3×3×3 mm BSPs; —▲—, dead cells from 2×2×2 mm BSPs. Each point represents the mean of triplicate flasks or dishes in these figures

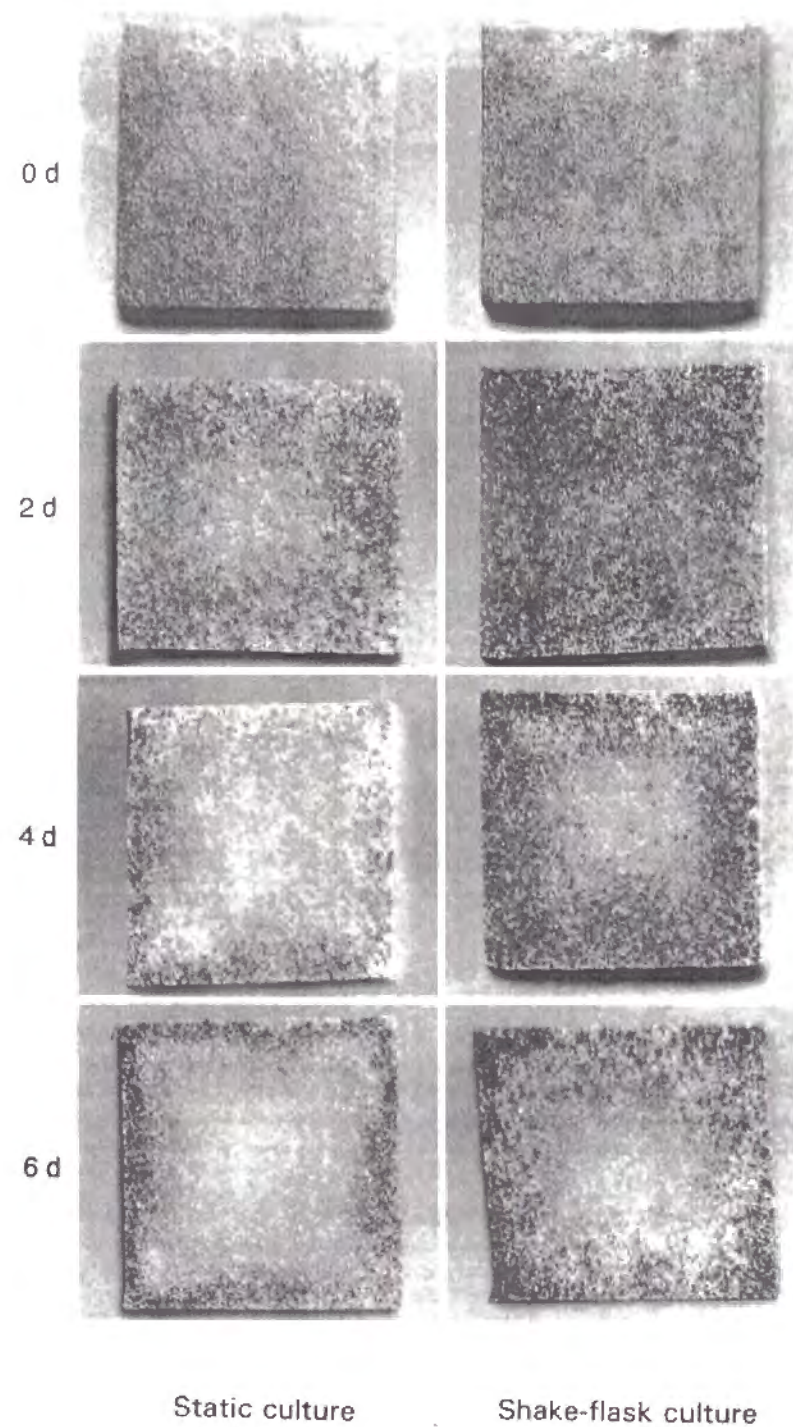
示唆される。しかし、ここで行なった静置・振とう培養は小規模のものであり保持粒子のサンプリングを頻繁に実施することができないため、固定化細胞の増殖・死滅挙動を厳密にリアルタイムで追跡できていない可能性がある。このため第6章では、バイオリアクターを用いる比較的大規模な培養実験を検討した。))

次に、振とう培養における固定化細胞の漏出速度、すなわち保持粒子 1 cm³ あたりから 1 日間に漏出した生細胞数および死細胞数の経時変化を **Fig. 5.3c** に示す。図にみられるように、漏出細胞数は、固定化細胞が活発に増殖した培養初期と後期に多くなっている。しかしながら、細胞の漏出は、細胞の死滅と比べると、固定化細胞の増殖挙動におよぼす影響は小さいことがわかる。

5. 3. 4 保持粒子内における生細胞の分布

生細胞により MTT (黄色) から変換された MTT formazan (紫色) は水に不溶となるので未反応の MTT を洗い流すと、保持粒子内において生細胞の存在した部分は紫色に染色された状態に残る。このため保持粒子の断面を観察することにより、粒子内の生細胞分布を把握することができた。Fig. 5.3 に結果を示した静置培養および振とう培養における、3×3×3 mm の保持粒子内の生細胞分布の経時変化を、**Fig. 5.4** に示す。写真はいずれも保持粒子の断面を示しており、黒く見える部分が MTT formazan で染色された部分、すなわち生細胞の存在した部分である。

経時変化をみていくと、培養初期においては静置培養、振とう培養のいずれにおいても、細胞は比較的保持粒子の中心付近まで存在している。ところが、培養 12 日目までは培養時間が経過するにつれて、保持粒子の表面近傍では細胞密度が高くなっていくとともに生細胞が存在している領域の厚みが薄くなっており、生細胞は粒子表面近傍に集密化していくことがわかる。これは、保持粒



(Fig. 5.4)

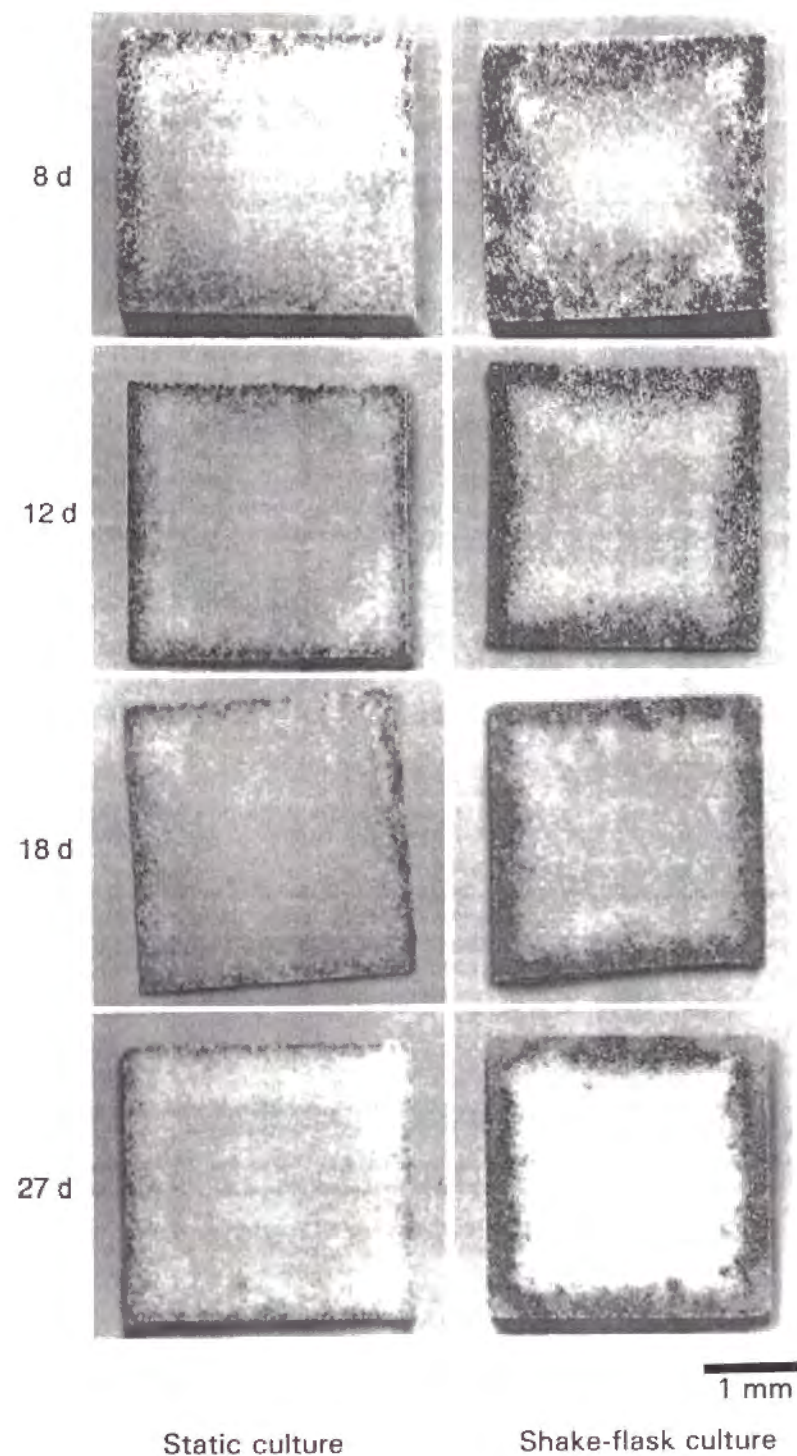


Fig. 5.4. Time course of distribution of viable cell population within $3 \times 3 \times 3$ mm BSPs in static or shake-flask cultures (cross sections)

子の表面近傍においては栄養分や溶存酸素が十分に存在するため細胞密度が局所的に高くなるが、これにともない保持粒子の中心付近では栄養分や酸素が不足し粒子内部の細胞が死滅していくためと考えられる。

また、静置培養に比べて振とう培養の方が、全般的に生細胞が存在する領域の厚みはより厚くなっている。これは、Fig. 5.3a にみられたように、静置培養に比べて振とう培養の方がより高い固定化細胞密度が得られたことに対応している。この原因は、静置培養に比べて振とう培養の方が、気相から培地への酸素の物質移動速度が大きいためと考えられる。

上述のように、振とう培養においては培養時間の経過とともに、保持粒子の表面近傍の細胞集団はより高密度に、また連続的になった。一方、アルギン酸カルシウムなどのゲルに包括された細胞はゲル内に形成された空隙内で増殖するため、ゲル粒子内に細胞のコロニーが不連続に点在することになる^{2,8,9)}。保持粒子に固定化された細胞が、保持粒子の表面近傍で連続的な細胞集団を形成するのは、PVF 樹脂多孔質体の連続的な細孔構造の中で、細胞の増殖が固定化担体から物理的な制限を受けていないことによるものと思われる。

次に、振とう培養において固定化生細胞密度が一旦低下した培養 18 日目には、写真にみられるように、生細胞が存在する部分の色調が全般にそれ以前と比べて薄くなっており、生細胞が存在する領域内で生細胞密度が全体的に低下していることがわかる。培養 27 日目には細胞密度は回復したが、写真をみると、生細胞が存在している領域の一部に色の濃い箇所ができており、この場所で局所的に生細胞密度がふたたび増加したためと考えられる。また、生細胞が存在する領域の厚みは、培養 12 日目以降約 300 μm でほぼ一定となった。したがって、生細胞の粒子表面近傍への集密化は培養の経過とともに単純に進行していくのではなく、細胞密度が飽和に達して以降は生細胞が存在する領域の厚みはほぼ一定となるが、この領域内で生細胞密度の不均一化が起こることがわかる。

このように生細胞が存在する領域内で生細胞密度が不均一になる理由は不明である。しかし、この現象は、細胞が局所的に非常に高い密度で集密化している状態を長時間安定に維持することは困難であることを示唆している可能性が考えられる。

また、上に述べたように、振とう培養において、細胞密度が飽和に達して以降、生細胞が存在する領域の厚みは約 300 μm でほぼ一定となったが、これは $2 \times 2 \times 2 \text{ mm}$ の保持粒子においても同様であった。生細胞が存在する領域の厚みが保持粒子の大きさに依存しないことは、保持粒子内で高い細胞密度を得るためには小さい粒子を用いる方が有利であることを示すものである。

5. 3. 5 初期細胞密度の影響

次に、細胞の播種後の初期細胞密度が固定化細胞の増殖挙動におよぼす影響を検討するために、Fig. 5.3 および 5.4 に結果を示した培養に比べて初期細胞密度を低くした振とう培養を行なった。Fig. 5.5 に、固定化細胞の MTT 変換活性から推定した固定化細胞の生細胞密度の経時変化を示す。図にみられるように、培養開始当初、固定化細胞は指数増殖しているが、そのみかけの比増殖速度は静置培養中の固定化していない細胞のそれと同等であり ($0.8\text{--}1.1 \text{ d}^{-1}$)、固定化により影響を受けなかった。これは、培養開始当初、細胞は保持粒子に固定化されることにより増殖を抑制されていないことを示すものと思われる。その後、固定化細胞密度は $3\text{--}4 \times 10^7 \text{ cells/cm}^3\text{-BSP}$ で飽和に達し、それ以降 Fig. 5.3a にみられたのと同様に固定化細胞密度の振動現象がみられた。

保持粒子内における生細胞の分布をみると、培養初期においては、生細胞が存在する部分は粒子内で不均一に点在していたが、Fig. 5.4 においてみられたのと同様に、やがて生細胞の粒子表面近傍への集密化が起こった。また、固定化細胞密度が飽和に達して以降は、MTT formazan で染色された部分の色調に濃淡

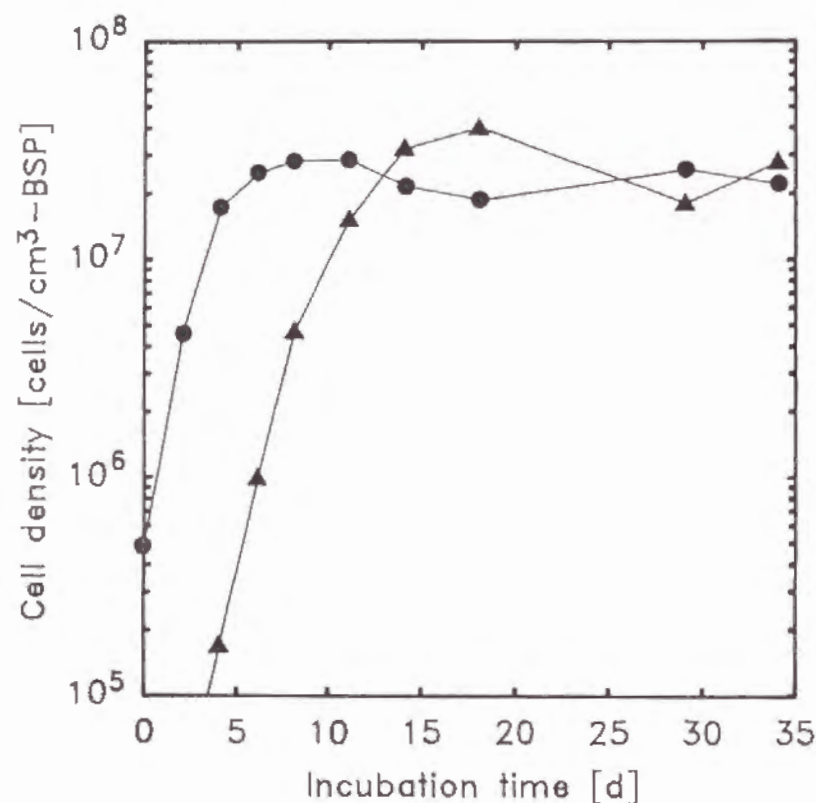


Fig. 5.5. Growth of immobilized cells within BSPs in a shake-flask culture with a lower initial cell density: ●, 3×3×3 mm BSPs; ▲, 2×2×2 mm BSPs. The density of viable cells entrapped within BSPs was evaluated by MTT assay. Each point represents the mean of triplicate flasks

の分布が生じ、生細胞密度は不均一になった。一方、アルギン酸やアガロースのゲルに細胞を包括固定化して培養する場合、生細胞が存在する領域の厚みは初期細胞密度に依存するという報告がなされている^{8,10)}。これに対し、細胞保持粒子を用いる固定化培養では初期細胞密度を低くした場合でも、生細胞が存在

する領域の最終的な厚みは Fig. 5.4 においてみられたのと同様の約 300 μm で、初期細胞密度によらず一定であった。これは固定化細胞の増殖が保持粒子の連続的な細孔構造の中で物理的な制限を受けていないことによるものと思われる。

以上に述べたように、細胞保持粒子に固定化された細胞の MTT 変換活性や LDH の培地中への放出量を測定することにより、固定化生細胞密度、保持粒子内における生細胞の分布、および死滅した細胞数の把握を試み、固定化細胞の静置・振とう培養下における増殖・死滅挙動を評価した。その結果、固定化細胞は保持粒子の表面近傍に集密化しており、酸素や栄養分の粒子内における物質移動律速が保持粒子内におけるこれ以上の高密度化を妨げていることなどが示唆された。このような解析は、今後、固定化細胞のさらなる高密度化やバイオリアクターの合理的設計、最適操作を行なうために、重要な情報を提供するものと思われる。

5. 4 結論

PVF 樹脂多孔質体の細胞保持粒子に固定化したミエローマの静置培養および振とう培養を行ない、固定化細胞の MTT 変換活性や細胞死にともない培地中に放出される LDH の活性を測定することにより、固定化細胞の増殖・死滅挙動の評価を行なった。固定化細胞は培養開始当初、静置培養中の固定化していない細胞と同等のみかけの比増殖速度で指数増殖した後、 $1\sim3 \times 10^7$ cells/cm³-BSP の固定化生細胞密度で飽和に達した。固定化細胞の死滅速度は固定化細胞密度の増加にともなって上昇し、固定化細胞密度が飽和に達して以降高い値を維持した。また、培養開始当初、固定化生細胞は時間の経過とともに保持粒子の表面近傍へ集密化した。固定化細胞密度が飽和に達して以降、生細胞の存在する領域の厚みはほぼ一定となったが、この領域内で生細胞密度の不均一化が起こることがわかった。

参考文献

- 1) Posillico, E.G., *Bio/Technology*, **4**, 114-117 (1986)
- 2) Wohlpart, D., J. Gainer and D. Kirwan, *Biotechnol. Bioeng.*, **37**, 1050-1053 (1991)
- 3) Mosmann, T., *J. Immunol. Methods*, **65**, 55-63 (1983)
- 4) Racher, A.J., D. Looby and J.B. Griffiths, *Cytotechnology*, **3**, 301-307 (1990)
- 5) Gardner, A.R., J.L. Gainer and D. Kirwan, *Biotechnol. Bioeng.*, **35**, 940-947 (1990)
- 6) Denizot, F. and R. Lang, *J. Immunol. Methods*, **89**, 271-277 (1986)
- 7) Al-Rubcai, M.A., S.C. Musgrave, C.A. Lambe, A.G. Walker, N.H. Evans and R.E. Spier, *Enzyme Microb. Technol.*, **12**, 459-463 (1990)
- 8) Al-Rubcai, M.A., S. Rookes and A.N. Emery, in *Physiology of immobilized cells* (J.A.M. de Bont, J. Visser, B. Mattiasson and J. Tramper, eds), Elsevier Science Publishers, Amsterdam, pp 181-188 (1990)
- 9) Hashimoto, K. and Y. Shirai, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **613**, 216-226 (1990)
- 10) Al-Rubcai, M.A. and R.E. Spier, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **31**, 430-433 (1989)

第6章 固定化動物細胞の連続培養下における増殖速度解析

6.1 緒言

前章では、生細胞の MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) 変換活性や細胞死にともなう乳酸脱水素酵素 (LDH) の培地への放出量を測定することにより、ポリビニルホルマール (PVF) 樹脂多孔質体の細胞保持粒子 (biomass support particles, BSPs) に固定化されたミエローマの静置・振とう培養下における増殖・死滅挙動の評価を行なった。前章で行なった静置培養や振とう培養は、定期的に培地を全量新鮮培地と交換する繰返し回分培養であるため、1回の回分操作中に培地中の栄養分などの濃度が大きく変動する。また、小規模の培養であるため、保持粒子のサンプリングを短い時間間隔で頻繁に行なうことは困難である。したがって、固定化細胞の増殖挙動をより定量的、速度論的に把握するためには、培養環境が大きく変化しない連続培養下において詳細なデータを蓄積することが望まれる。

前章でも述べたように、多孔性の細胞保持粒子に浮遊性動物細胞を固定化して培養する場合、固定化細胞の保持粒子内における死滅や保持粒子からの漏出は避けられない¹⁾。このため、固定化細胞の増殖の速度過程を解析する場合、固定化細胞の死滅・漏出を考慮する必要がある。最近、Wagner ら²⁾は、マイクロキャリアに接着した付着性細胞の灌流培養を行ない、培地中に放出された LDH 活性の経時変化を測定することにより、細胞の剥離や死滅を考慮した細胞の増殖速度の解析を行なっている。

前章では、固定化生細胞密度は固定化細胞の MTT 変換活性から推算し、死滅細胞数については培地中の LDH 活性から推定を行ない、また漏出細胞数は顕微鏡下で細胞を計数することにより測定した。ところが、固定化生細胞密度や漏出細胞数は、それぞれ固定化細胞および漏出細胞の細胞内 LDH 活性を測定する

ことによっても推定可能であると思われる。このことにより、固定化生細胞密度、死滅細胞数、および漏出細胞数のすべてを同一の方法で統一的に評価することができる。

本章ではまず、PVF 樹脂多孔質体の細胞保持粒子に固定化したミエローマの振とう培養実験を行ない、細胞を固定化した保持粒子を細切することにより回収した固定化細胞の細胞内 LDH 比活性 (生細胞 10^6 cells あたりの細胞内 LDH 活性) および MTT 変換比活性 (生細胞 10^6 cells あたりの MTT 変換活性) を測定し、固定化細胞の細胞内 LDH 活性や MTT 変換活性に基づく細胞数評価の妥当性を定量的に検討した。次に、攪拌槽型培養槽を用いて保持粒子に固定化したミエローマの灌流培養を行ない、固定化細胞および漏出細胞の細胞内 LDH 活性と培養上清の LDH 活性とを経時的に測定することにより、保持粒子に固定化された細胞の死滅・漏出を考慮した固定化細胞の増殖過程の解析を行なった。

6. 2 実験

6. 2. 1 細胞、培地、および細胞保持粒子

浮遊性動物細胞として、マウスミエローマ MPC-11 (ATCC CCL 167) を使用した。

培地は、基本合成培地として RPMI 1640 培地、ダルベッコ変法イーグル培地 (DME)、ハム F12 培地を 2:1:1 の比で混合した RDF 培地 (RPMI 1640, 5.46 g/l; DME, 2.62 g/l; F12, 2.78g/l) に、 NaHCO_3 を 1.05 g/l, HEPES (*N*-(2-hydroxyethyl)piperazine-*N'*-(2-ethane sulphonic acid)) を 4.77 g/l, ペニシリンを 10^5 units/l, ストレプトマイシンを 0.1 g unit/l, ITES (インスリン, 5 mg/l; トランスフェリン, 10 mg/l; エタノールアミン, 1.53 mg/l; 亜セレン酸ナトリウム, 4.3 $\mu\text{g/l}$), および牛血清アルブミンを 5 g/l 添加した無血清培地を用いた。攪拌槽型培養槽における培養実験では、シリコンポリマー系の消泡剤 (Antifoam

B emulsion, Sigma) を 0.1 ml/l 添加したものを使用した。

また、細胞保持粒子として、平均孔径 60 μm , 空隙率 0.88, みかけ密度 0.15 g/cm³ の PVF 樹脂スポンジシート (カネボウ化成) を $3 \times 3 \times 3$ mm の大きさに切ったものを使用した。

6. 2. 2 固定化細胞の細胞内 LDH 比活性と MTT 変換比活性の測定

50 ml 容量のねじ口三角振とうフラスコ (柴田科学) 10 本に保持粒子を 30 個ずつ入れ、これに指数増殖期にある細胞懸濁培地 (生細胞密度: 3.9×10^5 cells/cm³) を 10 ml ずつ加え、往復振とう恒温槽にて大気中で 24 h 振とうすることにより (振とう速度, 80 min⁻¹; 振幅, 4 cm; 培養温度, 37°C), 細胞を保持粒子に播種した。細胞の播種操作後、細胞懸濁培地を除去し、新鮮培地を 10 ml 加え、毎日培地を 10 ml 全量新鮮培地と交換しながら振とう培養を継続した。

培養中適宜、フラスコを 2 本ずつサンプリングし、保持粒子を新鮮培地中でカミソリにて細切し、ピペッティングして細胞を遊離させることにより、保持粒子から固定化細胞を回収した。次に、(1) 回収した固定化細胞を含む培地中の生細胞密度、(2) 回収細胞を懸濁した培地の LDH 活性、および (3) 回収細胞を含む培地を遠心分離することにより細胞を除去して得た上清の LDH 活性を測定し、回収した固定化細胞の細胞内 LDH 比活性 (生細胞 10^6 cells あたりの細胞内 LDH 活性) を求めた (6. 2. 4 参照)。また、回収した固定化細胞を懸濁した培地に MTT 溶液を加えて MTT formazan (1-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-3,5-diphenyl formazan) の生成量を測定することにより (6. 2. 5 参照)、回収した固定化細胞の MTT 変換比活性 (生細胞 10^6 cells あたりの MTT 変換活性) を求めた。

6. 2. 3 固定化細胞の灌流培養

50 ml 容量の三角振とうフラスコ 12 本に保持粒子を 51 個ずつ入れ、これに細胞懸濁培地 (生細胞密度: 3.9×10^5 cells/cm³) をそれぞれ 10 ml ずつ加え大気中で 24 h 往復振とうすることにより (振とう速度, 80 min⁻¹; 振幅, 4 cm; 培養温度, 37°C), 細胞を保持粒子に播種した。

細胞を播種した保持粒子のうち 600 個を、新鮮培地を満たした、Fig. 6.1 に示

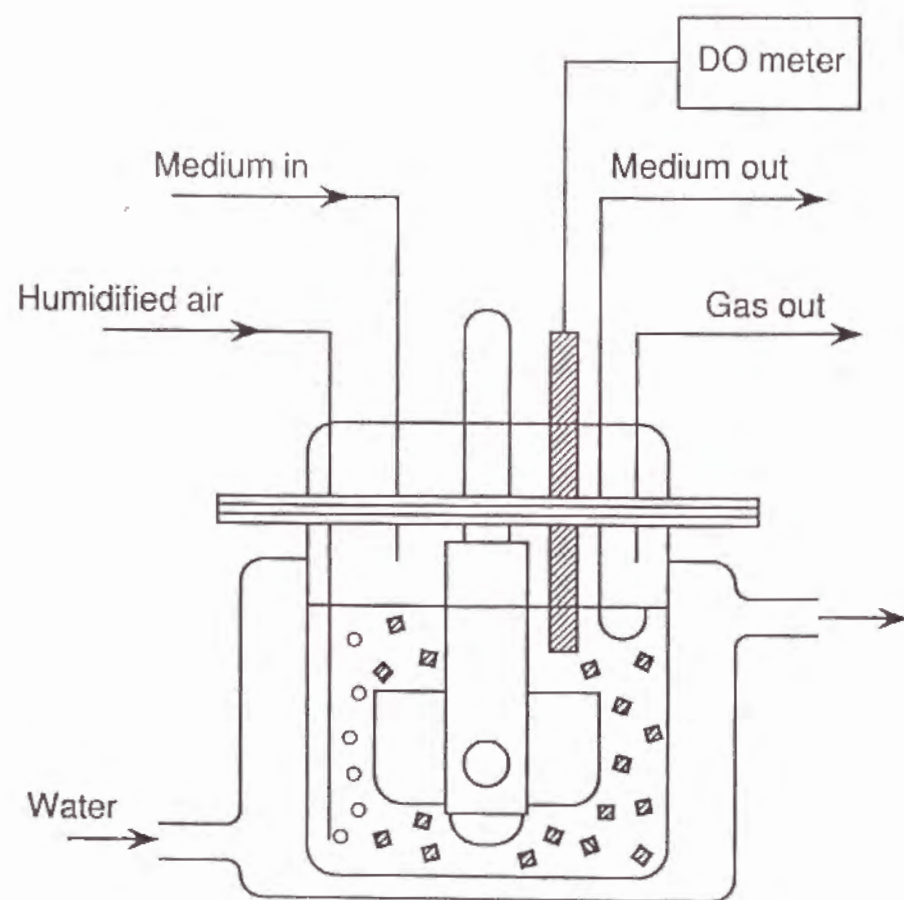


Fig. 6.1. Schematic diagram of the perfusion culture system

す攪拌槽型培養槽に移した。ペリスタルティックポンプを用いて、新鮮培地を 32 ml/h の速度で連続的に培養液面に滴下すると同時に、培養液面に接するノズルから新鮮培地の供給速度より大きな速度で培養液を吸引除去することにより、培地の灌流を行ない、槽内の培養液量を 248 ml で一定に維持した。培養液および保持粒子の攪拌は、つり下げ型の平羽根をマグネティックスターラーにて 100 rpm の速度で回転させることにより行なった。通気は、加湿空気をノズルから 50 ml/min の速度で培地中にバブリングすることにより行なった。培養液の温度は、培養槽のジャケットに温水を流すことで、37°C に維持した。適宜、培養槽上部のサンプリングポートより、保持粒子 10 個と培養液約 6 ml を無菌的にサンプリングし、分析に使用した。また、培地中の溶存酸素濃度 (dissolved oxygen, DO) を溶存酸素電極 (Ingold Messtechnik) により計測した。

サンプリングした保持粒子 10 個のうち、7 個の粒子を用いて、固定化細胞の細胞内 LDH 活性を測定した (6. 2. 1 参照)。残りの保持粒子 3 個は、MTT 溶液 3 ml に浸漬し、生細胞を染色した (6. 2. 5 参照)。サンプリングした漏出細胞懸濁培地については、その LDH 活性と、遠心分離により漏出細胞を除去した上清の LDH 活性とを測定した (6. 2. 4 参照)。

6. 2. 4 LDH 活性の測定

固定化していない細胞 (静置培養中の固定化していない細胞、振とう培養において保持粒子から回収した細胞、および灌流培養における漏出細胞) を懸濁した培地を遠心分離して細胞を除去した上清の LDH 活性は、そのまま市販のキット (和光純薬工業) を用いて NADH (nicotinamide adenine dinucleotide, reduced form) の減少量を比色定量することにより測定した。固定化していない細胞を懸濁した培地の LDH 活性は、細胞懸濁培地 1 ml に 0.5% Triton X-100 (polyethylene glycol mono-p-isooctylphenyl ether) 溶液を 1 ml 加えて細胞を溶解

した後に測定を行なった。ここで、0.5% Triton X-100 溶液は、ダルベッコのリン酸緩衝食塩水 (PBS) に Triton X-100 を 0.5% (v/v) の濃度で溶解することにより調製したものである。固定化していない細胞 (静置培養中の固定化していない細胞および振とう培養において保持粒子から回収した細胞) の細胞内 LDH 比活性は、(1) 細胞懸濁培地の LDH 活性と (2) その上清の LDH 活性との差および (3) 細胞懸濁培地の生細胞密度から算出した。また、灌流培養においてサンプリングした保持粒子に固定化された細胞の細胞内 LDH 活性は、保持粒子 7 個を 0.5% Triton X-100 溶液 4 ml に浸漬することにより固定化細胞を溶解した後に測定を行なった。

6. 2. 5 MTT 変換活性の測定と固定化生細胞の染色

細胞の MTT 変換活性の測定は、Denizot ら³⁾ の方法に基づき次のように行なった。固定化していない細胞 (静置培養中の固定化していない細胞および振とう培養において保持粒子から回収した細胞) を懸濁した培地 1 ml に MTT 溶液 (MTT, 1 g/l; RPMI 1640, 5.46 g/l; DME, 2.62 g/l; F12, 2.78 g/l; NaHCO₃, 1.05 g/l; HEPES, 4.77 g/l; これらを溶解した後、孔径 0.22 μm のフィルターでろ過したもの) を 3 ml 加え、37°C で 4 h インキュベートした。反応終了後、遠心分離により染色された細胞を沈降させてから未反応の MTT 溶液を吸引除去し、これに 2-プロパノールを 6 ml 加えてよく攪拌することにより、生成した MTT formazan を溶解した。この溶液の 560 nm と 700 nm における吸光度を測定し、吸光度の差を求めた。吸光度の差から、別に測定した MTT formazan (Sigma) の吸光係数を用いて、MTT formazan の生成量を算出した。

また、灌流培養実験においてサンプリングした保持粒子 3 個を MTT 溶液 3 ml に浸漬し 37°C で 4 h 以上インキュベートすることにより、生細胞を染色した。染色後、ダルベッコの PBS で洗浄した保持粒子をカミソリで切断し、粒子の断

面を実体顕微鏡で観察することにより、粒子内の生細胞分布を把握した。

6. 2. 6 その他の分析方法

固定化していない細胞の生細胞密度は、細胞懸濁培地に 0.4% トリパンプルー溶液を 9:1 の比で加えた後、未染色細胞を顕微鏡下 Burker Turk 型血球計算板にて計数することにより行なった。培養液中のグルコース濃度は、グルコースアナライザー (Beckman Instruments) を用いて測定した。

6. 3 累積細胞数および比速度の計算方法

6. 3. 1 累積細胞数の計算方法

固定化細胞の灌流培養において、撹拌槽型培養槽内の漏出生細胞密度 C_{Xf} [10^6 cells/cm³] の変化は、漏出生細胞の増殖・死滅、培養槽外への細胞の排出、細胞の保持粒子からの漏出、および保持粒子への再捕捉を考えると、次式で表される。

$$V \frac{dC_{Xf}}{dt} = \mu_f \cdot C_{Xf} \cdot V - k_{Df} \cdot C_{Xf} \cdot V - v \cdot C_{Xf} + r_{Leak} \cdot V_{BSPs} - r_{Entrap} \cdot V_{BSPs} \quad (1)$$

ここで、 t , 時間 [d]; V , 培養液体積 [cm³]; V_{BSPs} , 保持粒子の体積 [cm³]; v , 培地の供給・排出速度 [cm³/d]; μ_f , 漏出細胞の比増殖速度 [d⁻¹]; k_{Df} , 漏出細胞の比死滅速度 [d⁻¹]; r_{Leak} , 固定化細胞の保持粒子からの漏出速度 [10^6 cells/(d·cm³-BSP)]; r_{Entrap} , 漏出生細胞の保持粒子への捕捉速度 [10^6 cells/(d·cm³-BSP)] である。

また、培養槽内における培養液の上清の LDH 活性 C_{LDH} [IU/cm³] の変化は、上述 (6. 2. 3) の灌流培養条件下では LDH の失活が無視できるので (6. 4.

2 参照), 固定化細胞および漏出細胞の死滅, LDH の培養槽外への排出を考えると, 次式で与えられる.

$$V \frac{dC_{LDH}}{dt} = \gamma_{LDH/X} \cdot r_{Death} \cdot V_{BSPs} + \gamma_{LDH/X} \cdot k_{Df} \cdot C_{Xf} \cdot V - v \cdot C_{LDH} \quad (2)$$

ここで, $\gamma_{LDH/X}$, 生細胞 10^6 個あたりの細胞内 LDH 活性 [IU/(10^6 cells)]; r_{Death} , 固定化細胞の死滅速度 [10^6 cells/($d \cdot cm^3$ -BSP)] である.

これらの式の μ_f , k_{Df} および $\gamma_{LDH/X}$ を一定として, あるサンプリング時刻 t_1 から次のサンプリング時刻 t_2 まで t について式 (1), (2) を積分すると, t_1 から t_2 までの間 ($[t_1, t_2]$) に保持粒子 $1 cm^3$ から漏出した細胞数 [10^6 cells/ cm^3 -BSP] および $[t_1, t_2]$ における保持粒子 $1 cm^3$ あたりの死滅細胞数 [10^6 cells/ cm^3 -BSP] は, それぞれ次の式 (3), (4) で与えられる.

$$\int_{t_1}^{t_2} (r_{Leak} - r_{Entrap}) dt = \frac{V}{V_{BSPs}} \left[\left\{ (C_{Xf})_{t=t_2} - (C_{Xf})_{t=t_1} \right\} - (\mu_f - k_{Df} - D) \int_{t_1}^{t_2} C_{Xf} dt \right] \quad (3)$$

$$\int_{t_1}^{t_2} r_{Death} dt = \frac{1}{\gamma_{LDH/X}} \cdot \frac{V}{V_{BSPs}} \left[\left\{ (C_{LDH})_{t=t_2} - (C_{LDH})_{t=t_1} \right\} + D \int_{t_1}^{t_2} C_{LDH} dt - \gamma_{LDH/X} \cdot k_{Df} \int_{t_1}^{t_2} C_{Xf} dt \right] \quad (4)$$

ここで, D は培地の希釈率 (空間速度) ($= v/V$) [d^{-1}] である.

式 (3), (4) より算出した各サンプリング時間間隔における保持粒子 $1 cm^3$ からの漏出細胞数および保持粒子 $1 cm^3$ あたりの死滅細胞数をそれぞれ培養開始

時 ($t = 0$) から任意のサンプリング時刻 ($t = t$) まで積算していくことにより, $[0, t]$ において保持粒子 $1 cm^3$ から漏出した累積細胞数 ($\int_0^t (r_{Leak} - r_{Entrap}) dt$) [10^6 cells/ cm^3 -BSP] および保持粒子 $1 cm^3$ あたりの累積死細胞数 ($\int_0^t r_{Death} dt$) [10^6 cells/ cm^3 -BSP] を算出した.

なお, 式 (3), (4) の計算において, C_{Xf} は漏出細胞懸濁培地の LDH 活性とその上清の LDH 活性との差から推算した値を使用し, $\gamma_{LDH/X}$ は静置培養中の固定化していない細胞の指数増殖期における細胞内 LDH 比活性の値を使用した (6. 4. 1 および 6. 4. 2 参照). また, μ_f および k_{Df} は, 上述 (6. 2. 3 参照) の固定化細胞の灌流培養と同じ条件下において固定化していない細胞の回分培養を行ない, 培養開始時と 24 h 後の全細胞密度および生細胞密度 (なお, これらの密度は細胞懸濁培地およびその上清の LDH 活性から推算した) より算出した値 ($\mu_f = 1.0 d^{-1}$, $k_{Df} = 0.59 d^{-1}$) を使用した.

また, 保持粒子 $1 cm^3$ あたりの全細胞数 C_{Xi} [10^6 cells/ cm^3 -BSP] の変化は次式で与えられる.

$$\frac{dC_{Xi}}{dt} = \frac{dC_{Xi}}{dt} + r_{Death} + (r_{Leak} - r_{Entrap}) \quad (5)$$

ここで, C_{Xi} は保持粒子に固定化された生細胞の密度 [10^6 cells/ cm^3 -BSP] である. 上式を t について積分すると, $t = 0$ において $C_{Xi} = C_{Xi}$ であるから, 次式が得られる.

$$C_{Xi} = C_{Xi} + \int_0^t r_{Death} dt + \int_0^t (r_{Leak} - r_{Entrap}) dt \quad (6)$$

式 (6) より, 時刻 t における C_{Xi} は, $t = t$ における固定化生細胞密度, $[0, t]$ に

おける累積死細胞数、および累積漏出細胞数の和として求められる。

6. 3. 2 固定化細胞の比速度の計算方法

保持粒子に固定化された生細胞の真の比増殖速度を μ_i [d^{-1}] とすると、保持粒子 1 cm^3 あたりにおいて次式の関係が成り立つ。

$$\frac{dC_{Xi}}{dt} = \mu_i \cdot C_{Xi} \quad (7)$$

μ_i を一定として、あるサンプリング時刻 t_1 から次のサンプリング時刻 t_2 まで t について式 (7) を積分することにより、 $[t_1, t_2]$ における μ_i は次式により計算できる。

$$\mu_i = \frac{(C_{Xi})_{t=t_2} - (C_{Xi})_{t=t_1}}{\int_{t_1}^{t_2} C_{Xi} dt} \quad (8)$$

なお、 μ_i は保持粒子 1 cm^3 あたりで平均化された値である。

同様に、保持粒子に固定化された生細胞の比死滅速度 k_{Di} [d^{-1}] および比漏出速度 k_{Li} [d^{-1}] を、それぞれ次の式 (9)、(10) で定義する。

$$r_{\text{Death}} = k_{Di} \cdot C_{Xi} \quad (9)$$

$$r_{\text{Leak}} - r_{\text{Entrap}} = k_{Li} \cdot C_{Xi} \quad (10)$$

これらの式の k_{Di} および k_{Li} を一定として、あるサンプリング時刻 t_1 から次のサ

ンプリング時刻 t_2 まで t について式 (9)、(10) を積分することにより、 $[t_1, t_2]$ における k_{Di} および k_{Li} はそれぞれ次の式 (11)、(12) から求められる。

$$k_{Di} = \frac{\int_{t_1}^{t_2} r_{\text{Death}} dt}{\int_{t_1}^{t_2} C_{Xi} dt} \quad (11)$$

$$k_{Li} = \frac{\int_{t_1}^{t_2} (r_{\text{Leak}} - r_{\text{Entrap}}) dt}{\int_{t_1}^{t_2} C_{Xi} dt} \quad (12)$$

なお、これらの比速度 k_{Di} および k_{Li} は、いずれも保持粒子 1 cm^3 あたりで平均化された値である。

また、保持粒子に固定化された生細胞のみかけの比増殖速度を $\mu_{i,\text{app}}$ [d^{-1}] とすると、保持粒子 1 cm^3 あたりにおいて次式の関係が成り立つ。

$$\frac{dC_{Xi}}{dt} = \mu_{i,\text{app}} \cdot C_{Xi} \quad (13)$$

$\mu_{i,\text{app}}$ は、式 (5)、(7)、(9) および (10) の関係より、次の式 (14) から求められる。

$$\mu_{i,\text{app}} = \mu_i - k_{Di} - k_{Li} \quad (14)$$

なお、 $\mu_{i,\text{app}}$ は保持粒子 1 cm^3 あたりで平均化された値である。

6. 4 結果と考察

6. 4. 1 固定化細胞の細胞内 LDH 比活性および MTT 変換比活性

第5章で述べたように、固定化していない MPC-11 の静置培養を行なうと指数増殖期においては、細胞内 LDH 比活性および MTT 変換比活性はほぼ一定の値となる。ところが、細胞が静止期や死滅期にいたると、これらの比活性は低下する。また、細胞株によっては、細胞内 LDH 比活性の値が、培養液の pH や DO などの培養環境により影響を受け、変動することが報告されている⁴⁾。そこで、細胞保持粒子に固定化した MPC-11 の振とう培養を行ない、保持粒子を細切することにより固定化細胞を回収し、固定化生細胞の細胞内 LDH 比活性および MTT 変換比活性の経時変化を測定した。回収した固定化生細胞の細胞内 LDH 比活性および MTT 変換比活性の経時変化を Fig. 6.2 に示す。なお、これらの活性は、静置培養中の固定化していない細胞の指数増殖期における細胞内 LDH 比活性および MTT 変換比活性をそれぞれ 1 とする相対値で表わしている。

図にみられるように、固定化細胞の細胞内 LDH 比活性および MTT 変換比活性は、静置培養中の固定化していない細胞の指数増殖期における値に比べて若干小さい値になっているものの、固定化していない細胞の値とほぼ同等の比活性を振とう培養中安定に維持していることがわかる。したがって、以下の検討においては、固定化していない細胞の指数増殖期における細胞内 LDH 比活性 ($\gamma_{LDH/X} = 0.27 \text{ IU}/(10^6 \text{ cells})$) の値を用いて、保持粒子に固定化された細胞の細胞内 LDH 活性の測定結果から固定化生細胞密度を推算した。また、保持粒子を MTT 溶液に浸漬することにより生細胞を染色し、粒子内の生細胞の分布を把握した。Fig. 6.2 の結果は、上述のような LDH 活性の測定による固定化生細胞密度の評価や MTT を用いる固定化生細胞の染色が、固定化生細胞数を若干小さく見積もる可能性はあるものの、定量的に妥当であることを示すものと思われる。

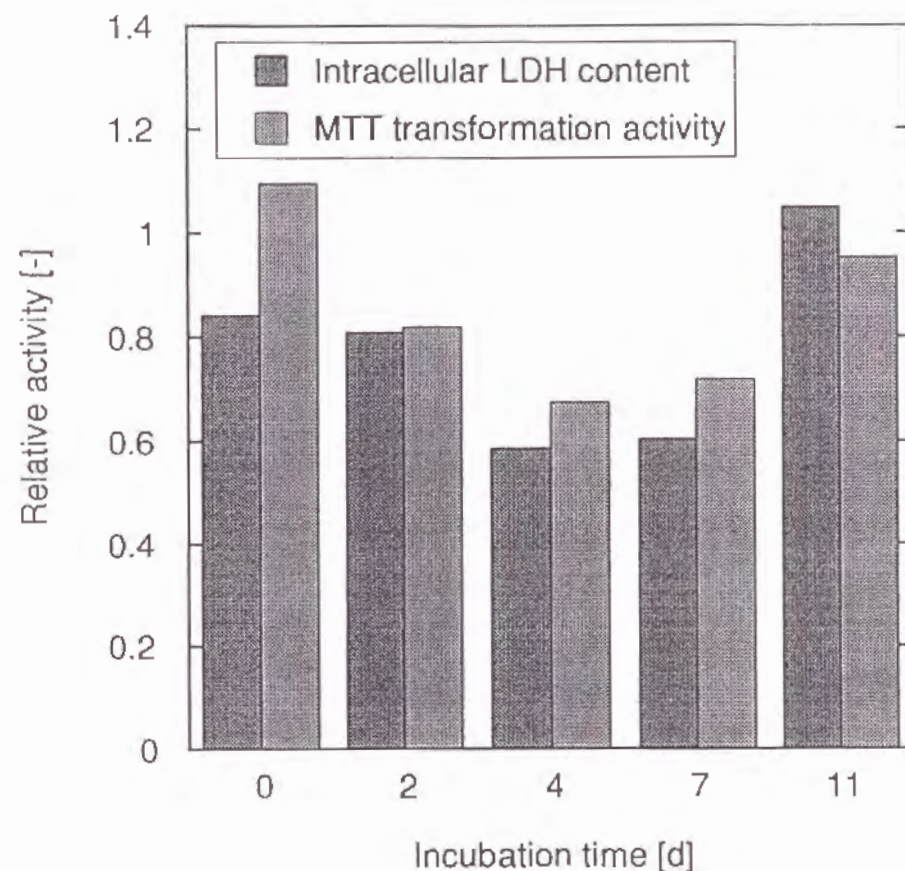


Fig. 6.2. Time courses of intracellular lactate dehydrogenase (LDH) content and specific MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) transformation activity of cells immobilized within biomass support particles (BSPs) in shake-flask culture. The intracellular LDH content and specific MTT transformation activity of immobilized cells are given as the relative values compared with those of non-immobilized cells in the exponential growth phase under static culture. The intracellular LDH content ($\gamma_{LDH/X}$) and specific MTT transformation activity of non-immobilized cells were $0.27 \text{ IU}/(10^6 \text{ cells})$ and $0.31 \mu\text{mol}/(10^6 \text{ cells})$, respectively

6. 4. 2 LDH 活性測定による漏出生細胞密度と死滅細胞数の評価

以下、保持粒子に固定化した細胞の灌流培養の結果について述べる。まず、Fig. 6.3 に、保持粒子 1 cm^3 あたりに固定化された細胞の細胞内 LDH 活性、保持粒子から漏出した細胞を懸濁した培地 1 cm^3 あたりの LDH 活性、および漏出

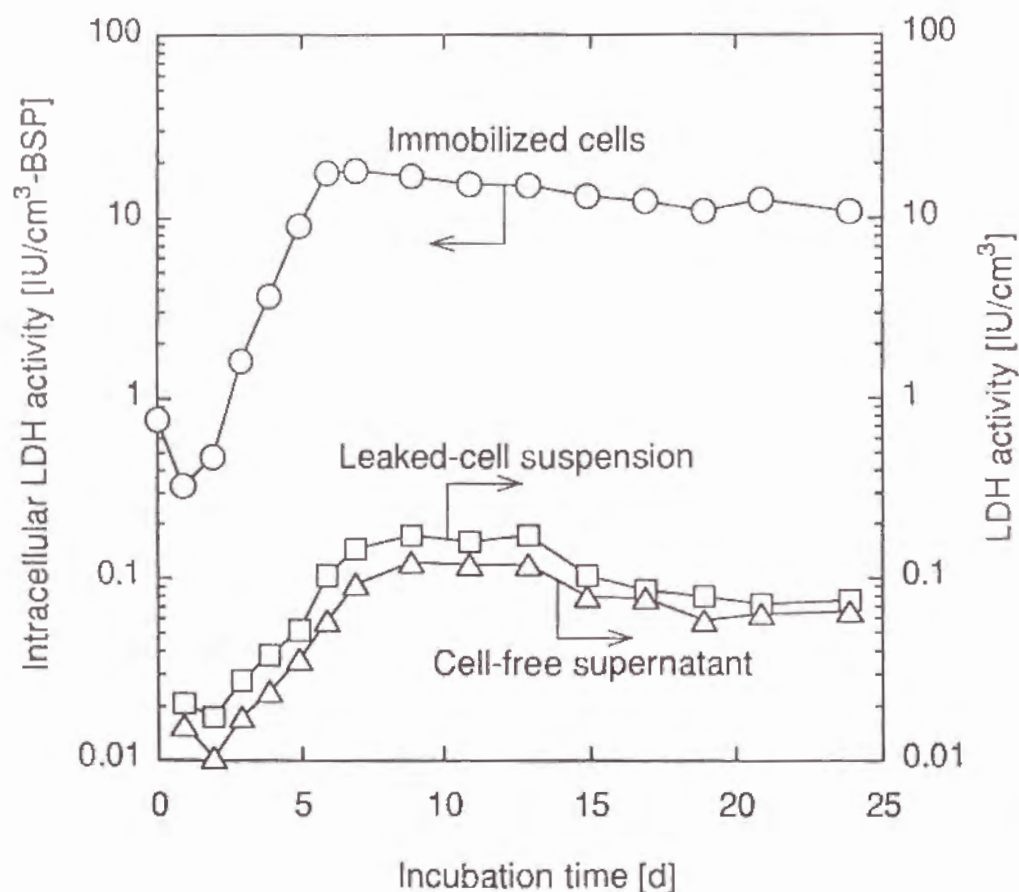


Fig. 6.3. Time courses of the intracellular LDH activity of cells immobilized within 1 cm^3 of BSPs (\circ), the LDH activity in 1 cm^3 of leaked-cell suspension (\square), and the LDH activity in 1 cm^3 of cell-free culture supernatant ($= C_{\text{LDH}}$) (\triangle) in perfusion culture

細胞懸濁培地の上清 1 cm^3 あたりの LDH 活性 (C_{LDH}) の経時変化を示す。これらの LDH 活性のうち、漏出細胞懸濁培地の LDH 活性と漏出細胞懸濁培地の上清の LDH 活性との差は、漏出生細胞に由来する。よって、これらの LDH 活性の差より、固定化していない細胞の指数増殖期における細胞内 LDH 比活性の値 ($\gamma_{\text{LDH/X}} = 0.27 \text{ IU}/(10^6 \text{ cells})$) を用いて、漏出生細胞密度を推算することができる。

漏出細胞懸濁培地の LDH 活性とその上清の LDH 活性との差から推算した漏出生細胞密度 (C_{X}) の経時変化と、トリパンプルー色素排除法を用いて顕微鏡下血球計算盤にて計数した漏出生細胞密度の経時変化との比較を、Fig. 6.4 に示す。図にみられるように、両者は良好な一致を示した。このことは、LDH 活性の測定による漏出細胞数の評価の妥当性を示すものである。

次に、培養液の上清の LDH 活性から、死滅細胞数を推算することについて考える。腎臓由来のある種の細胞株においては、トリパンプルーを細胞外に排除することができないことから死細胞と判断された細胞でも、まだ細胞内に一部の LDH が残存していることが報告されている²⁾。MPC-11 の場合、Fig. 6.4 において、漏出細胞の細胞内 LDH 活性から推算した漏出生細胞密度の経時変化と、トリパンプルー色素排除法を用いて顕微鏡下計数した漏出生細胞密度の経時変化とは良好な一致を示した。このことは、トリパンプルー色素排除法により死細胞と判断された MPC-11 が細胞内のすべての LDH を培地中に放出していることを意味する。したがって、培養液の上清の LDH 活性から死滅細胞数を推算することは妥当であると思われる。

また、細胞株によっては、培養液中に放出された LDH は不安定で、失活速度が大きいことが報告されている⁵⁾。この場合、培養液中の LDH 活性から死滅細胞数を推算するに際し、LDH の失活を考慮する必要がある。そこで、MPC-11 から放出された LDH を含む培地を、固定化細胞の灌流培養と同じ条件下 (ただし、培地の灌流は行なわない) において通気攪拌し、LDH 活性の経時変化を測

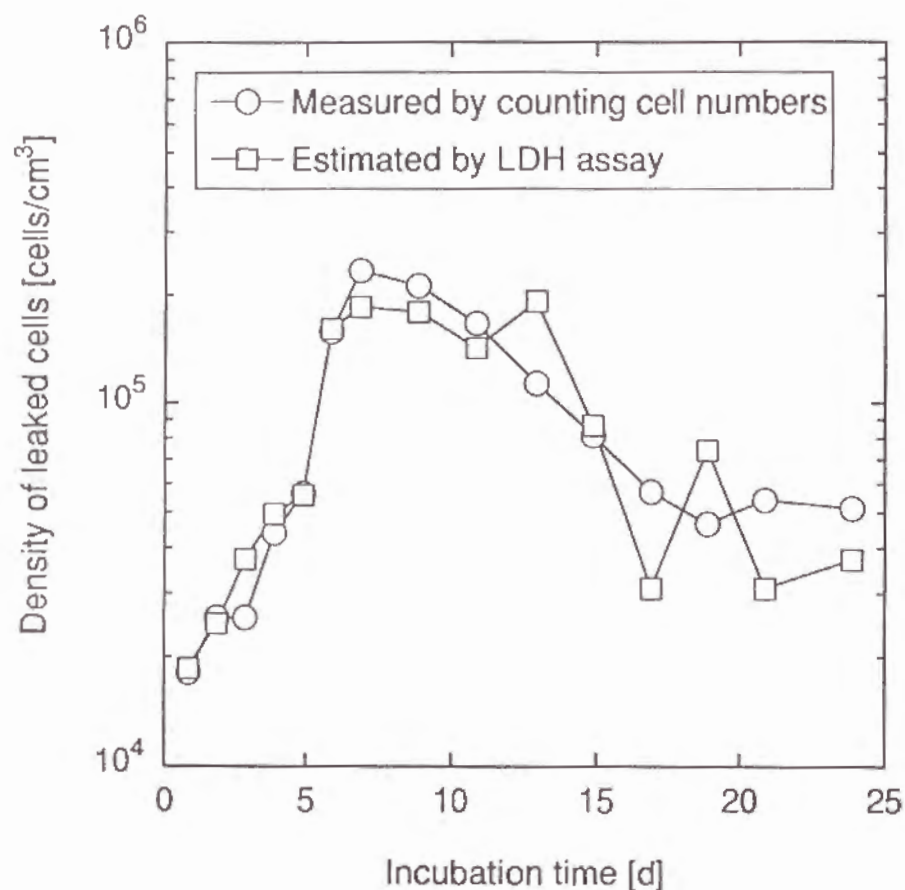


Fig. 6.4. Comparison of the time course of the density of leaked viable cells determined by two methods in perfusion culture: estimation by LDH assay ($= C_{Xp}$) (\square) and measurement by counting cell numbers (\circ)

定した。その結果、3日後においても LDH 活性はほとんど低下せず、MPC-11 由来の LDH は非常に安定であることを確認した。したがって、以下の検討では LDH の失活を考慮せず、固定化していない細胞の指数増殖期における細胞内 LDH 比活性の値 ($\gamma_{LDH/X} = 0.27 \text{ IU}/(10^6 \text{ cells})$) を用いて、培養液 (漏出細胞

懸濁培地) の上清の LDH 活性の測定結果より累積死細胞数を算出した。

以上に述べたように、本検討は、固定化生細胞密度、死滅細胞数、および漏出細胞数のすべてを、3種類の LDH 活性 (固定化細胞の細胞内 LDH 活性と漏出細胞懸濁培地およびその上清の LDH 活性) を測定することにより、同一の方法で評価するものである。

6. 4. 3 固定化細胞の増殖特性

固定化細胞の灌流培養における固定化生細胞密度 (C_{Xf})、保持粒子 1 cm^3 あたりの累積死細胞数 ($\int_0^t r_{\text{Death}} dt$)、保持粒子 1 cm^3 あたりからの累積漏出細胞数 ($\int_0^t (r_{\text{Leak}} - r_{\text{Intrap}}) dt$)、および保持粒子 1 cm^3 あたりの累積全細胞数 (C_{Xt}) の経時変化を Fig. 6.5 に示す。また、培養液中のグルコース濃度および DO の経時変化を Fig. 6.6 に示す。

Fig. 6.5 にみられるように、固定化生細胞密度は、培養1日目一旦低下した後、培養2日目以降指数関数的に増加した。培養1日目から6日目までの間、固定化生細胞密度は片対数グラフ上でほぼ直線的に増加しており、このことはその間固定化細胞のみかけの比増殖速度が一定であることを示している。培養6日目には固定化細胞は $6.3 \times 10^7 \text{ cells/cm}^3$ -BSP と非常に高い密度となり、その後飽和に達した。培養液中のグルコース濃度および DO は、Fig. 6.6 にみられるように、培養7日目付近で極小値をとった後増加に転じた。固定化生細胞密度の指数関数的な増加が停止した培養7日目においても、培養液中にグルコースや溶存酸素は十分量残存していることから、固定化生細胞密度が飽和に達したのは、単純に培地中の栄養分や溶存酸素の濃度の低下が原因ではないと思われる。

また、累積死細胞数、累積漏出細胞数、および累積全細胞数の経時変化も、培養1日目から6日目までの培養初期において、ほぼ指数関数的に増加した。

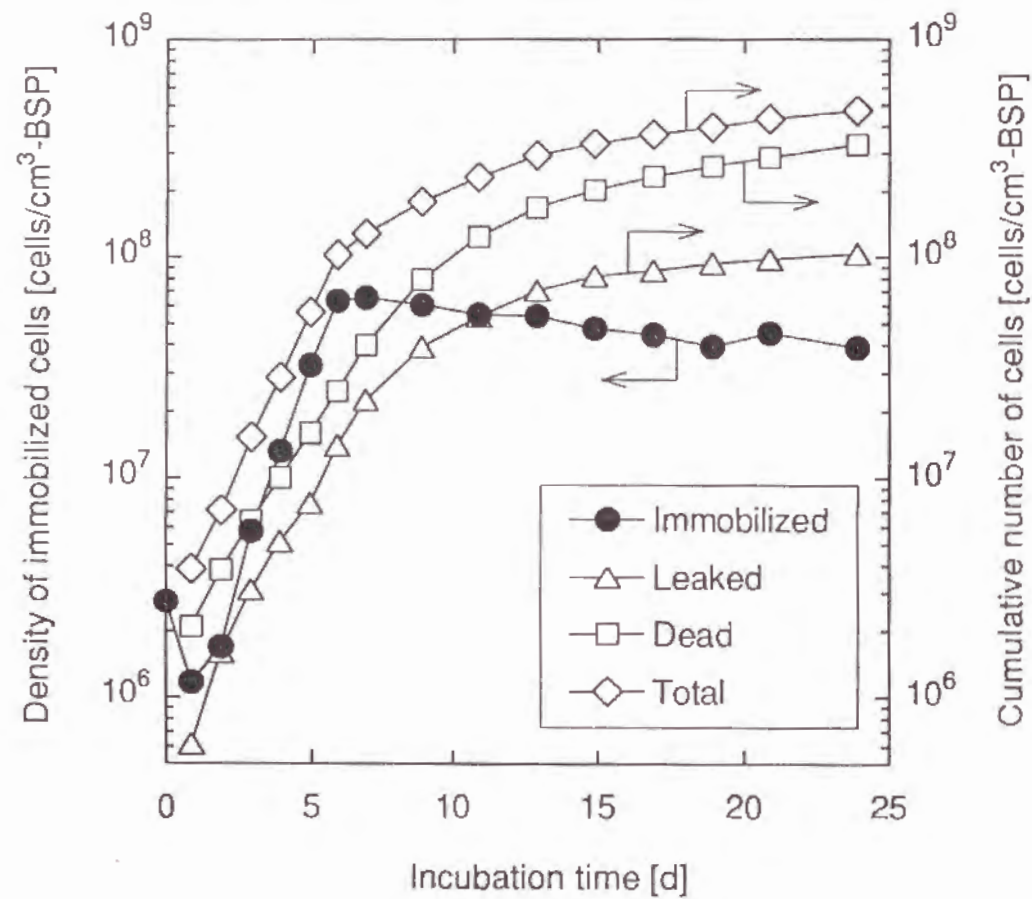


Fig. 6.5. Time courses of the density of immobilized cells ($= C_{Xi}$) (\bullet), the cumulative number of leaked cells from 1 cm³ of BSPs ($= \int_0^t (r_{Leak} - r_{Entrap}) dt$) (\triangle), the cumulative number of dead cells within 1 cm³ BSP ($= \int_0^t r_{Death} dt$) (\square), and the total number of cells within 1 cm³ BSP ($= C_{Xi}$) (\diamond) in perfusion culture

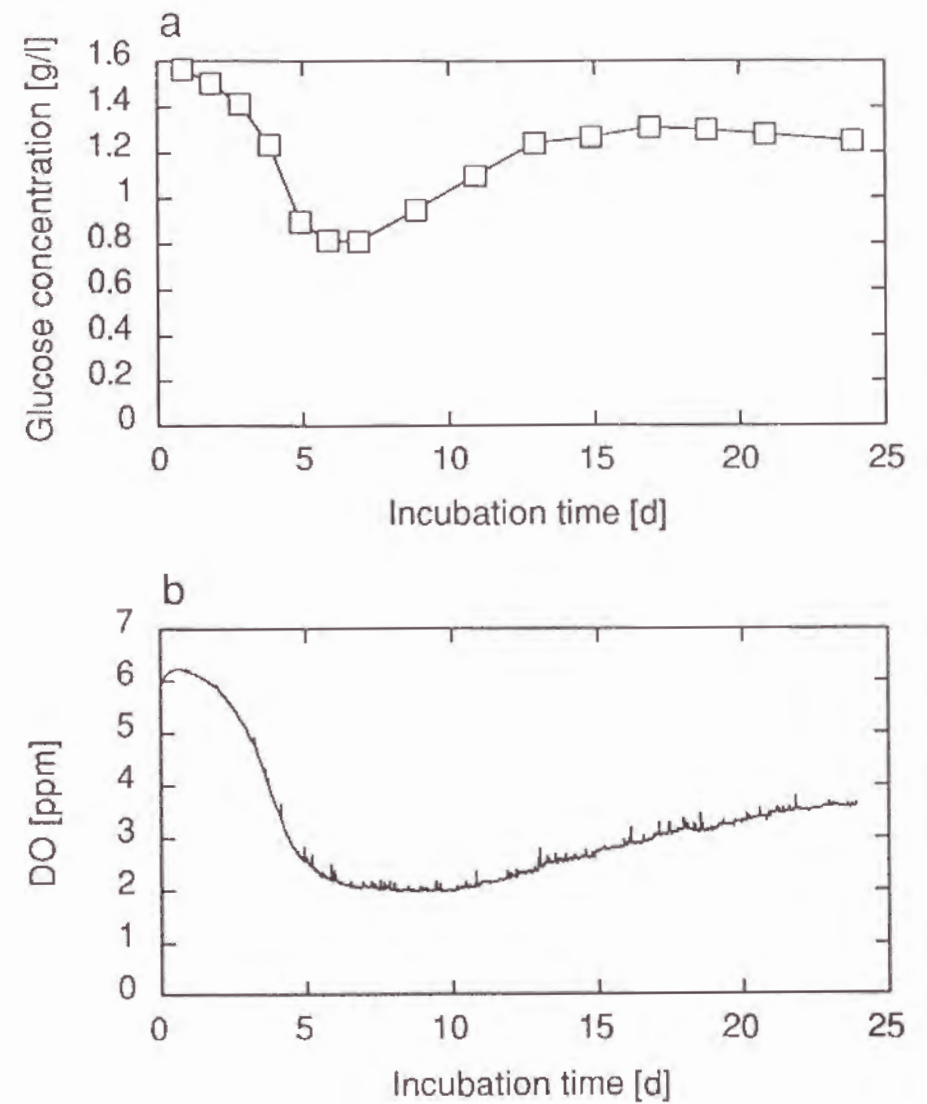


Fig 6.6a, b. Time course of (a) glucose concentration and (b) dissolved oxygen concentration (DO) in perfusion culture

培養6日目以降固定化生細胞密度は飽和に達したが、累積死細胞数と累積漏出細胞数は、それ以降も培養9日目まで指数関数的に増加している。培養11日目以降、累積死細胞数と累積漏出細胞数はいずれも指数関数的な増加を示さなくなったが、引き続き固定化細胞の死滅と漏出は起こっている。この結果、固定化生細胞密度、累積死細胞数、および累積漏出細胞数の総和である累積全細胞数も、培養期間中常に増加した。よって、培養6日目以降固定化生細胞密度はみかけ上増加していないものの、固定化細胞の増殖は保持粒子内で継続して起こっていることは明らかである。

次に、保持粒子に固定化された生細胞の真の比増殖速度 (μ_i)、比死滅速度 (k_{Di})、比漏出速度 (k_{Li})、およびみかけの比増殖速度 ($\mu_{i,app}$) の経時変化を、Fig. 6.7 に示す。次節で述べるように、固定化生細胞は保持粒子の表面近傍に偏在しており、粒子内で固定化生細胞密度に高低の分布が生じている。Fig. 6.7 に経時変化を示す比速度は、いずれも保持粒子内で平均化された固定化生細胞密度や漏出細胞数、死滅細胞数から算出した値である。

上でも述べたように、固定化細胞のみかけの比増殖速度は、培養開始直後においてばらつきがあるものの、培養1日目から6日目までの間、ほぼ一定であった。これに対し、細胞の死滅と漏出を考慮した固定化細胞の真の比増殖速度は、Fig. 6.7 にみられるように、培養2日目から7日目までの間に急激に低下していくことがわかる。同様に固定化細胞の比死滅速度および比漏出速度も、培養初期において低下している。これに対し、培養7日目以降は、固定化細胞の真の比増殖速度、比死滅速度、および比漏出速度は、いずれもほぼ一定の値となった。この間、固定化細胞の真の比増殖速度は、比死滅速度と比漏出速度との和とほぼ同等であり、したがって固定化細胞のみかけの比増殖速度はほぼ0となっている。これは、Fig. 6.5 において培養7日目以降、固定化生細胞密度が飽和に達したことに相当する。

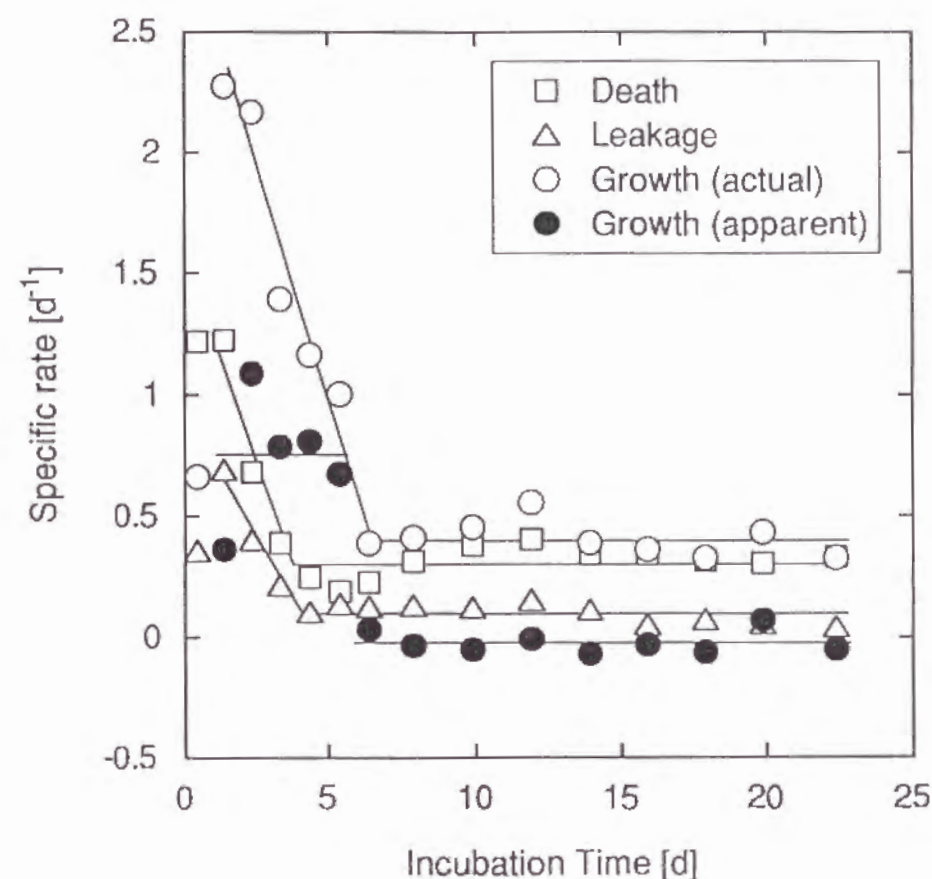


Fig. 6.7. Time courses of specific rates of actual growth ($= \mu_i$) (\circ), apparent growth ($= \mu_{i,app}$) (\bullet), death ($= k_{Di}$) (\square), and leakage ($= k_{Li}$) (\triangle) of immobilized cells in perfusion culture. These specific rates are the averaged values within 1 cm³ of BSPs

上で述べたような、培養初期における固定化細胞の真の比増殖速度の著しい低下が、どのような原因によるものかは不明である。固定化生細胞密度が飽和に達した培養7日目においても、培養液中に溶存酸素やグルコースはまだ十分量存在したことから、比増殖速度の著しい低下は、培養液中のDOや栄養分の

濃度の低下が原因ではないものと思われる。後にみるように (Fig. 6.8 参照), 固定化生細胞は保持粒子のごく表面近傍で高密度に集密化していることから, 培養時間の経過とともに細胞が増殖可能な空間が減少していくことにより, 細胞の増殖が物理的に抑制されることが理由の1つとして考えられる。

ハイブリドーマの培養によるモノクローナル抗体の生産においては, 細胞の増殖速度と抗体生産速度は負の相関関係にある, すなわち, 細胞増殖が抑制されれば抗体生産速度は増大することが報告されている^{6,7)}。細胞保持粒子に浮遊性細胞を固定化して培養を行なうと, 上でみたように細胞の増殖は抑制された。このことは, 固定化により細胞の有用物質の比生産速度が増大することもあり得ることを示唆するものと思われる。

6. 4. 4 保持粒子内の生細胞分布の推移

灌流培養においてサンプリングした保持粒子内の固定化生細胞を MTT を用いて染色し, 粒子内の生細胞の分布を観察した。染色した保持粒子の断面の顕微鏡写真を, Fig. 6.8 に示す。断面において黒く見える部分が, MTT formazan で染色された場所, すなわち生細胞の存在したところである。写真にみられるように, 生細胞は, 培養開始当初においては保持粒子の比較的内部まで存在するが (培養4日目), 培養が進むにつれてしだいに保持粒子の表面近傍に高密度に集密化していくことがわかる (培養5-9日目)。この結果, 培養9-13日目において生細胞が存在する領域の厚みは 160-180 μm ときわめて薄くなった。

Fig. 6.5 にみられたように, 培養6日目以降固定化生細胞密度が飽和に達したにもかかわらず, 累積死細胞数は培養13日目まで引き続き増加した。上に述べたように, 保持粒子の表面近傍において生細胞が存在する領域の厚みは培養9日目までしだいに薄くなっており, この間, 生細胞が存在する領域において局所的な細胞密度は高くなっていく一方, この領域の内側 (保持粒子の中心

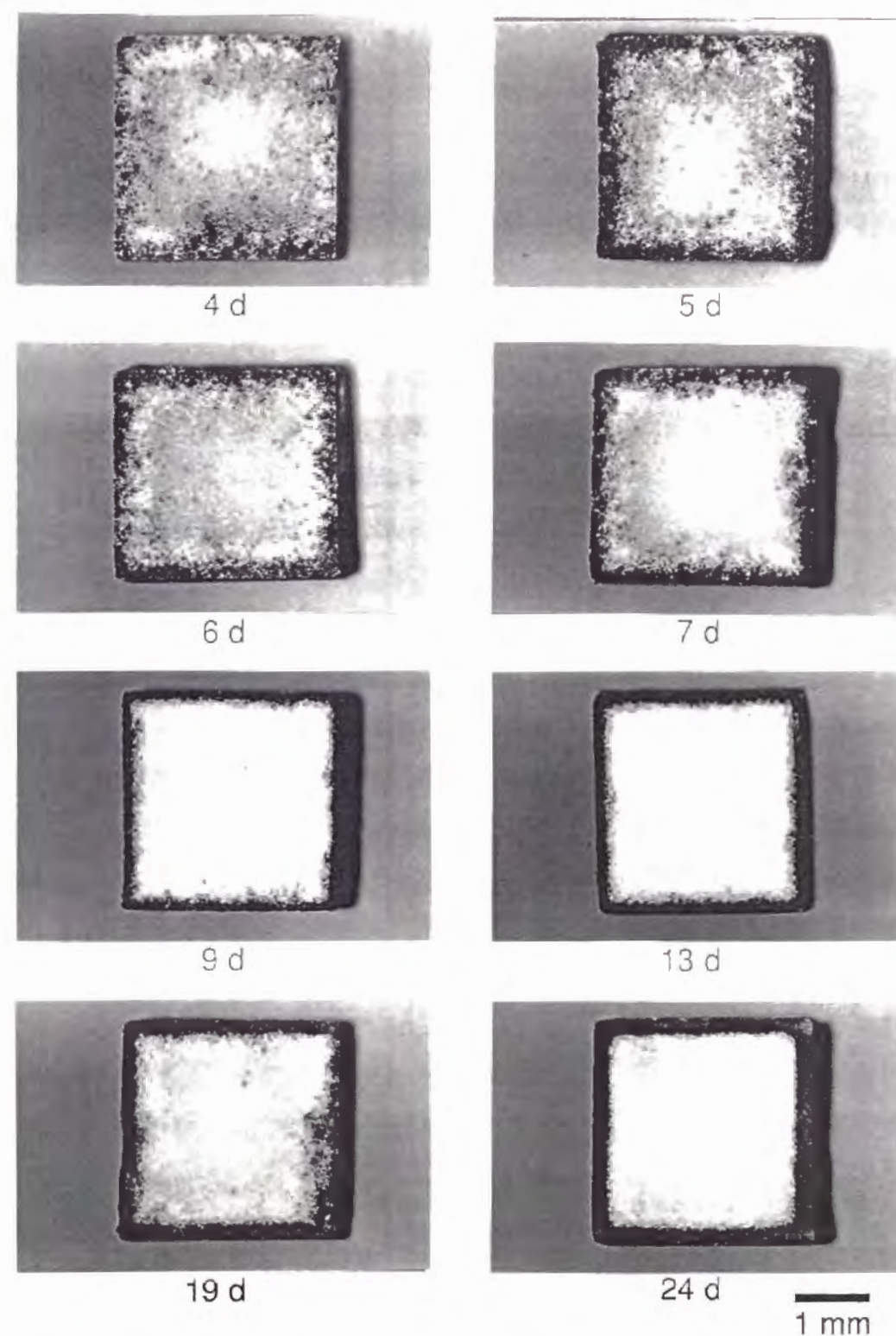


Fig 6.8. Time course of distribution of viable cells within BSPs in perfusion culture (cross sections)

側)の部分においては細胞の死滅が活発に起こっていることがわかる。この観察結果は、Fig. 6.6 にみられた累積死細胞数の増加傾向と一致するものである。

その後、固定化生細胞密度が徐々に低下するにともない、生細胞が存在する領域の厚みは若干厚くなった(培養 19 日目, 220 μm ; 培養 24 日目, 240 μm)。この結果は、培養が進行し、固定化細胞が保持粒子の表面近傍に高密度に集密化した後でも、細胞はまだ粒子の内側に侵入可能であることを示している。この現象は、保持粒子の表面近傍における局所的な生細胞密度が低くなったことにより、溶存酸素や栄養分が保持粒子の表面からより離れた領域まで移動できるようになったため、生細胞が粒子のより内側でも生育可能になったことによるものと思われる。また、培養 19 日目以降、第 5 章で述べた固定化細胞の振とう培養実験の結果と同様、MTT formazan で染色された部分の色調に濃淡の分布が観察され、生細胞が存在する領域において生細胞密度が不均一になった。

以上に述べたように、攪拌槽型培養槽を用いて細胞保持粒子に固定化したミエローマの灌流培養を行ない、固定化細胞の細胞内 LDH 活性と漏出細胞懸濁培地およびその上清の LDH 活性とを測定することにより、保持粒子に固定化された細胞の死滅・漏出を考慮した固定化細胞の増殖過程の解析を行なった。また、MTT を用いて固定化生細胞を染色し、保持粒子内における生細胞分布の推移を追跡すると、LDH 活性を測定することにより把握した固定化細胞の増殖・死滅挙動と定性的に一致する現象がみられた。このような解析は、固定化細胞の保持粒子内における増殖挙動に関する定量的または速度論的なデータを提供できる有効な手段であると思われる。今後、そのようなデータを蓄積し、固定化細胞の増殖を数学的に記述できるモデルを作成することにより、工業的規模のプロセスにおいて、固定化細胞の高密度培養やバイオリアクターの合理的設計、最適操作を実現していくことが期待される。

6. 5 結論

PVF 樹脂多孔質体の細胞保持粒子に固定化したミエローマの振とう培養を行ない、細胞を固定化した保持粒子を細切することにより回収した固定化細胞の細胞内 LDH 比活性および MTT 変換比活性の経時変化を測定した。振とう培養中の固定化細胞の細胞内 LDH 比活性および MTT 変換比活性は、いずれも静置培養中の固定化していない細胞の指数増殖期における活性とほぼ同等の値を維持した。このことからまず、固定化細胞の細胞内 LDH 活性や MTT 変換活性に基づく細胞密度の評価法の妥当性を定量的に確認した。

次に、細胞保持粒子に固定化したミエローマの灌流培養を行ない、固定化細胞および漏出細胞の細胞内 LDH 活性と培養上清の LDH 活性とを測定することにより、固定化生細胞密度、累積死細胞数、累積漏出細胞数、および累積全細胞数の経時変化を算出した。さらに、それらの経時変化から、固定化細胞の死滅と漏出を考慮した固定化生細胞の真の比増殖速度と、みかけの比増殖速度とを求めた。培養開始当初、固定化生細胞密度は指数関数的に増加し、固定化細胞のみかけの比増殖速度はほぼ一定であった。これに対し、固定化細胞の真の比増殖速度は、培養初期において急激に低下した。固定化細胞密度が飽和に達して以降、固定化細胞の真の比増殖速度は、指数増殖期における値と比べて著しく小さい値となったものの、ほぼ一定の値を維持した。また、累積全細胞数は培養中常に増加したことから、固定化生細胞密度はみかけ上増加していないものの、固定化細胞の増殖は継続して起こっていることがわかった。

参考文献

- 1) 寺嶋修司, 小川達也, 上平正道, 安田公昭, 飯島信司, 小林猛, 生物工学会誌, **71**, 165-170 (1993)
- 2) Wagner, A., A. Marc, J.M. Engasser and A. Einsele, *Biotechnol. Bioeng.*, **39**,

320-326 (1992)

- 3) Denizot, F. and R. Lang, *J. Immunol. Methods*, **89**, 271-277 (1986)
- 4) Geaugcy, V., F. Pascal, J.M. Engasser and A. Mare, *Biotechnol. Tech.*, **4**, 257-262 (1990)
- 5) Lee, D.W., J.R. Grace, B.K.C. Chow, R.T.A. MacGillivray and D.G. Kilburn, *Cytotechnology*, **5**, 233-241 (1991)
- 6) Suzuki, E. and D.F. Ollis, *Biotechnol. Prog.*, **6**, 231-236 (1990)
- 7) 鈴木英二, 高橋一成, 牧島房夫, 森田晴彦, 化学工学論文集, **19**, 198-206 (1993)

総 括

動物細胞培養は、各種のサイトカイン、ホルモン、ウイルスワクチン、モノクローナル抗体などを生産する目的で、近年、幅広く利用されるようになった。このため、動物細胞を大量に、しかも効率よく培養する技術の確立が求められている。

動物細胞は通常その増殖速度や有用物質の生産速度が小さいため、有用物質を大量にかつ効率よく得るためには、細胞の増殖に要する時間よりも十分長い時間にわたって細胞を高密度状態で培養し、有用物質を継続的に産生させる技術を構築する必要がある。このような動物細胞の高密度培養は、細胞を培養系内に保持したまま、有害代謝産物を除去し新たに栄養分や酸素を供給することにより可能になると考えられる。このためには、細胞と培養液を分離する技術が不可欠である。

ハイブリドーマなどの浮遊性の動物細胞を固定化して培養すると、細胞をそのまま懸濁状態で培養するのに比べて、細胞と培養液の分離を簡単にかつ効率よく行なうことができる。動物細胞の固定化培養はさらに、(1) 細胞が固定化担体内に保持されるため物理的外力に弱い動物細胞を保護することができる、(2) バイオリアクターの設計や操作の点で自由度が大きい、などの利点をもつ。したがって、固定化培養は、動物細胞の産生する有用物質を工業的規模で生産するための手段として、有望な方法の一つであると考えられる。

このため動物細胞の様々な固定化培養技術の開発が検討されているが、工業的に応用するには解決すべき課題が残されているものが多く、また、バイオリアクターの合理的設計や最適操作を行なうに際し不可欠であると思われる、固定化動物細胞の培養特性の把握に関する報告も少ない。

本研究では、有用物質生産を行なうための動物細胞培養技術として、浮遊性

細胞を対象とした固定化培養について検討を行なった。細胞の固定化法は、(1) 細胞を担体内に人為的に固定化するいわゆる "active" な固定化法と、(2) 多孔性の担体を用いて細胞を自然に固定化する "passive" な方法との大きく2つに分けられる。本研究は、(1) active な固定化法として、アルギン酸カルシウムゲル包括固定化法について、また (2) passive な固定化法として、新たに開発した、ポリビニルホルマール樹脂多孔質体を細胞保持粒子として用いる固定化法について、active な固定化法と passive な固定化法の両面から、固定化培養の諸特性を明らかにするとともに、工業的に応用可能な技術を開発することを目的に検討を行なったものである。

第I編では、浮遊性動物細胞の active な固定化法であるアルギン酸カルシウムゲル包括法について、ゲル粒子の特性を考慮した適切なバイオリアクターの開発と、ゲル粒子内に固定化された細胞の増殖に最も影響をおよぼすと考えられる酸素消費についてその特性の把握とを検討した。

第1章では、まず、ヒトマウスハイブリドーマ 4H11 を 1% アルギン酸カルシウムゲル粒子に包括固定化し、血清培地と無血清培地を使用して固定化細胞の静置培養を行なった。その結果、いずれの培地を使用しても、ゲル内の生細胞密度が 1×10^7 cells/cm³-gel 程度の高密度培養が達成できること、およびモノクローナル抗体の比生産速度が固定化により影響されないことを確認した。次に、培養槽底部から培地を緩やかに供給する膨張層型培養槽に、細胞を固定化したゲル粒子を充填し、無血清培地を使用した連続培養を行なった。アルギン酸カルシウムゲルは培養時間の経過とともにゲル粒子の強度がしだいに小さくなったが、膨張層型培養槽を用いることによりゲル粒子が破壊されることなく、40 日以上にわたって 1×10^7 cells/cm³-gel 以上の高密度培養とモノクローナル抗体の生産が可能であることがわかった。

第2章では、アルギン酸カルシウムゲル粒子に包括固定化したハイブリド-

マの比酸素消費速度を測定し、固定化していない細胞の比酸素消費速度との比較検討を行なった。固定化細胞の比酸素消費速度は、固定化直後においては固定化していない細胞のそれと同等であったが、培養の経過とともに増加することを見出した。一方、固定化細胞の比グルコース消費速度は若干減少した。この固定化細胞の比酸素消費速度の増加は、ゲル粒子内における細胞のコロニーの形成と密接に関係していることを明らかにした。

固定化細胞のゲル粒子内におけるコロニーの形成にともない、固定化細胞の比酸素消費速度が増加するという現象は、細胞を固定化しない培養からは予想できない、固定化増殖細胞に特徴的なものである。今後、このような固定化増殖細胞の特性が発現するメカニズムを解明し、細胞の物質生産性や機能の増強に結び付けていくことが望まれる。

第II編では、ポリビニルホルマール (PVF) 樹脂多孔質体を細胞保持粒子 (biomass support particles, BSPs) として用いる浮遊性動物細胞の新たな固定化法の開発と、保持粒子内における固定化細胞の増殖特性の解明とを検討した。

第3章では、平均孔径が 30-100 μ m の PVF 樹脂多孔質体を細胞保持粒子として用いる浮遊性動物細胞の固定化の可能性を、静置・振とう培養において検討した。保持粒子上にマウスミエローマ MPC-11 を懸濁した培地を滴下することで、また保持粒子を細胞懸濁培地とともに振とうすることにより、細胞を粒子内に 1×10^6 cells/cm³-BSP 以上の密度で捕捉することができた。捕捉された細胞は保持粒子のマトリックス内でコロニーを形成することにより物理的に固定化され、静置培養、振とう培養のいずれにおいても粒子内で 1×10^7 cells/cm³-BSP 程度の高密度培養が容易に達成できることを明らかにした。

第4章では、底部から直接気泡通気することにより固定化担体粒子を緩やかに循環させる循環層型培養槽を用いて、PVF 樹脂多孔質体の細胞保持粒子に固定化したミエローマの無血清培地を用いる長期培養を試み、バイオリアクター

における固定化培養の可能性を検討した。細胞懸濁培地中で保持粒子を循環させることにより細胞を粒子に播種できたが、培養初期においては細胞の漏出が著しく、細胞のグルコース消費速度は一旦低下した。しかしながら、培養を継続すると、グルコース消費速度は増加に転じ、漏出細胞数も減少した。一方、細胞の播種後数日間のみ培養槽の上部でバブリングにより通気することで静的に培養した後、保持粒子を循環させる2段階培養を行なうと、細胞のグルコースの消費速度は非常に大きくなり、少なくとも 1×10^7 cells/cm³-BSP 以上の高細胞密度化と約 100 日間の長期培養が達成できた。

以上に述べたように、比較的安価であり、機械的な強度も大きく、オートクレーブによる滅菌が可能である PVF 樹脂多孔質体のうち、比較的孔径の小さいものを細胞保持粒子として用いることにより、複雑な操作を要することなく浮遊性動物細胞を固定化し長期間高密度培養を行なうことができた。したがって、本固定化培養法は、工業的規模でも応用可能なポテンシャルを有するものと思われる。

第5章では、PVF 樹脂多孔質体の細胞保持粒子に固定化したミエローマの静置・振とう培養を行ない、固定化細胞の MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) 変換活性や細胞死にともない培地中に放出される乳酸脱水素酵素 (LDH) の活性を測定することにより、固定化細胞の増殖・死滅挙動の評価を行なった。固定化細胞は、培養開始当初、静置培養中の固定化していない細胞と同等のみかけの比増殖速度で指数増殖した後、 $1-3 \times 10^7$ cells/cm³-BSP の固定化生細胞密度で飽和に達した。固定化細胞の死滅速度は、固定化細胞密度の増加にともなって上昇し、固定化細胞密度が飽和に達して以降高い値を維持した。また、培養開始当初、固定化生細胞は、時間の経過とともに保持粒子の表面近傍へ集密化した。固定化細胞密度が飽和に達して以降、生細胞の存在する領域の厚みはほぼ一定となったが、生細胞密度の不均一化が

起こることがわかった。

第6章では、まず、PVF 樹脂多孔質体の細胞保持粒子に固定化したミエローマの振とう培養を行ない、固定化細胞の細胞内 LDH 比活性および MTT 変換比活性が、いずれも静置培養中の固定化していない細胞の指数増殖期における活性とほぼ同等の値を維持していたことから、固定化細胞の細胞内 LDH 活性や MTT 変換活性に基づく細胞密度評価法の妥当性を定量的に確認した。次に、細胞保持粒子に固定化したミエローマの灌流培養を行ない、固定化細胞および漏出細胞の細胞内 LDH 活性と培養上清の LDH 活性とを測定することにより、固定化生細胞密度と、死細胞、漏出細胞を含む累積全細胞数の経時変化とを算出した。さらに、それらの経時変化から、固定化細胞の死滅と漏出を考慮した真の比増殖速度と、みかけの比増殖速度とを求めた。培養開始当初、固定化生細胞密度は指数関数的に増加し、固定化細胞のみかけの比増殖速度はほぼ一定であった。これに対し、固定化細胞の真の比増殖速度は、培養初期において急激に低下した。また、固定化細胞密度が飽和に達して以降、固定化細胞の真の比増殖速度は、指数増殖期における値と比べて著しく小さい値となるものの、ほぼ一定の値を維持することがわかった。

上述のように、生細胞による MTT 変換反応を利用することで、また細胞内 LDH 活性や培地中に遊離した LDH 活性を測定することにより、細胞保持粒子に固定化された細胞の増殖挙動を把握することができた。このような解析は、固定化細胞の増殖に関する定量的または速度論的なデータを提供できる有効な手段であると思われる。今後それらのデータを蓄積していくことにより、固定化細胞の保持粒子内における増殖挙動を数学的に表現できるモデルを構築し、工業的規模のプロセスにおいて、固定化細胞の高密度培養やバイオリクターの合理的設計・最適操作を実現することが望まれる。

現在、世界各地で動物細胞の様々な固定化培養技術が研究されており、なか

には工業化に成功した例もみられるようになった。有用物質生産のための動物細胞培養は微生物培養に比べると新しい分野であり、固定化培養技術が工業的規模での有用物質生産に利用される可能性は大きいと考えられる。今後、固定化にともなう動物細胞の諸特性の変化のメカニズムが解明され、また固定化細胞の担体内における増殖モデルが構築されることにより、固定化動物細胞培養技術の工業的規模での応用例が増加していくことが期待される。

謝 辞

本研究を遂行し論文としてまとめることができましたのは多数の方々の御指導と御援助の賜物であり、この場を借りて厚く感謝の意を表わします。

本論文の作成にあたり適切なる御指導と御助言を賜りました京都大学工学部化学工学教室橋本健治教授、合成・生物化学教室田中渥夫教授、化学工学教室東谷公教授、合成・生物化学教室加藤滋雄助教授に厚く御礼申し上げます。

本論文第Ⅰ編は、橋本健治教授の研究室における成果であります。研究を遂行するにあたり御懇篤なる御指導と御鞭撻を賜りました橋本健治教授には、感謝の念が尽きません。また、当時研究室で直接御指導と御教示をいただきました九州工業大学情報工学部生物化学システム工学科白井義人助教授に心から御礼申し上げます。さらに、研究を進めるにあたり御協力をいただき、また苦楽をともにした川原弘之氏、小川直樹氏に感謝いたします。

本論文第Ⅱ編は、鐘淵化学工業株式会社生産技術研究所において昭和62年から平成5年までに行なった研究をまとめたものです。研究の機会を与えてくださいました故森川久初代所長、多大なる御援助をいただきました野島康弘前所長、多くの御助言と激励を賜りました島雄所長に深く感謝申し上げます。また、当時の上司であられました神戸大学工学部応用化学科福田秀樹教授には、大胆な発想でもって始終研究をリードしていただき、また適切なる御指導と心暖まる励ましを賜りました。衷心より御礼申し上げます。最後に、研究の細部にわたる御助言と絶えず激励を賜りました生産技術研究所（現在、総合研究所プロセス研究部）の皆様には深甚なる謝意を表わします。

本研究に関連する著者の発表論文

- 1) Continuous production of monoclonal antibody
with immobilized hybridoma cells in an expanded bed fermentor
Yoshihito Shirai, Kenji Hashimoto, Hideki Yamaji,
and Michiyuki Tokashiki
Appl. Microbiol. Biotechnol., **26**, 495-499 (1987)
- 2) Oxygen uptake rate of immobilized growing hybridoma cells
Yoshihito Shirai, Kenji Hashimoto, Hideki Yamaji,
and Hiroyuki Kawahara
Appl. Microbiol. Biotechnol., **29**, 113-118 (1988)
- 3) Immobilisation of anchorage-independent animal cells using
reticulated polyvinyl formal resin biomass support particles
Hideki Yamaji, Hideki Fukuda, Yasuhiro Nojima, and Colin Webb
Appl. Microbiol. Biotechnol., **30**, 609-613 (1989)
- 4) Long-term cultivation of anchorage-independent animal cells
immobilized within reticulated biomass support particles
in a circulating bed fermentor
Hideki Yamaji and Hideki Fukuda
Appl. Microbiol. Biotechnol., **34**, 730-734 (1991)
- 5) Growth and death behaviour of anchorage-independent
animal cells immobilized within porous support matrices
Hideki Yamaji and Hideki Fukuda
Appl. Microbiol. Biotechnol., **37**, 244-251 (1992)

- 6) Growth kinetics of animal cells immobilized within
porous support particles in a perfusion culture
Hideki Yamaji and Hideki Fukuda
(Submitted for publication)